

Quantitative Proteomanalyse des prädatorischen Bakteriums *Bdellovibrio bacteriovorus*

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. René Becker

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Michael W. Linscheid

2. PD Dr. Michael Weller

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2018

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel von mir angefertigt wurde.

Berlin, den

René Becker _____

Danksagung

Meinen Betreuern Prof. Dr. MICHAEL W. LINSCHIED und PD Dr. MICHAEL WELLER möchte ich für die Möglichkeit danken, dieses interessante Thema bearbeiten zu können. Weiterhin möchte ich mich auch für die Betreuung und den gewährten wissenschaftlichen Freiraum bedanken.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises Angewandte Analytik und Umweltchemie danken. Hierbei möchte ich insbesondere Dr. SEBASTIAN BECK danken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und viel dazu beigetragen hat, dass das Projekt erfolgreich verlief. Weiterhin möchte ich Dr. GUNNAR SCHWARZ danken, der mich im Zuge meiner Diplomarbeit in die Welt der Bioanalytik eingeführt hat und mich auch während der Promotion mit dem einen oder anderen Rat unterstützte. Bei Dr. AHMED EL-KHATIB möchte ich mich für die Unterstützung bei den ICP-MS-Messungen bedanken. JULE VÖLZKE (geb. HEIMERL) danke ich für die Zusammenarbeit bei ihrer Bachelorarbeit und ihrem Forschungspraktikum.

Der German-Israeli Foundation (GIF) danke ich für die Finanzierung des Projektes zu *B. bacteriovorus*. In dem Zusammenhang möchte ich meinen Kooperationspartnern aus Israel für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Hierbei möchte ich insbesondere Prof. Dr. EDOUARD JURKEVITCH, Dr. OFIR AVIDAN und Dr. RAJESH SATHYAMOORTHY für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für die Bereitstellung von Probenmaterial danken.

Ich möchte auch der Proteome Factory AG danken. Hierbei möchte ich insbesondere ULF BERGMANN und FRANZ HUSCHNER danken, die stets mit Messzeit und Ratschlägen aushalfen, wenn es Probleme gab. FRANZ HUSCHNER danke ich weiterhin auch für die Zusammenarbeit bei den SCX-Fraktionierungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen (ehemaligen) Mit-Doktoranden Dr. DAVID BENDA, Dr. LENA RUHE, STEFANIE ICKERT, Dr. SABRINA TROG und Dr. PIERRE WRZOLEK, die mir auch Abseits vom Laboralltag eine schöne und lustige Zeit bescherten und von denen viele über die Jahre zu sehr guten Freunden wurden. Weiterhin möchte ich meinem Kung Fu Trainer NIELS KLEINERT, meinem Geigenlehrer JOHANN-VINCENT SLAWINSKI und meinen ehemaligen Japanischlehrerinnen danken, die mit ihrer Anleitung und Betreuung für einen Ausgleich zum Arbeitsalltag sorgten.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken, die mich während der Doktorandenzeit stets unterstützten.

Zusammenfassung

Durch den exzessiven Gebrauch von Antibiotika haben sich in den letzten Jahren bei immer mehr pathogenen Bakterien Antibiotikaresistenzen herausgebildet. Diese multiresistenten Keime stellen die Gesundheitssysteme zunehmend vor Probleme. Eine potentielle Alternative zu konventionellen Antibiotika sind prädatorische Bakterien. Diese gram-negativen Bakterien jagen aktiv andere Bakterien, um diese für den eigenen Stoffwechsel bzw. die eigene Reproduktion zu verwenden. *Bdellovibrio bacteriovorus*, ein Vertreter der prädatorischen Bakterien, hat einen zweiphasigen Lebenszyklus bestehend aus einer Angriffsphase, in der es aktiv andere gram-negative Bakterien jagt, und einer Wachstumsphase, in der es sich in den periplasmatischen Raum eines Wirtes einnistet und dessen Zytoplasma als Substrat für die eigene Reproduktion nutzt.

Für einen künftigen Einsatz von *B. bacteriovorus* als Antibiotikum ist es notwendig, die Prozesse, die während des Lebenszyklus ablaufen, zu verstehen. Dafür ist essentiell, die Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression während des Lebenszyklus aufzuklären. Während es bereits umfangreiche Untersuchungen bezüglich des Genoms und des Transkriptoms von *B. bacteriovorus* gibt, sind bisher nur wenige Informationen bezüglich des Proteoms, insbesondere im Hinblick auf Veränderungen während des Lebenszyklus, bekannt. Daher wurde in dieser Arbeit die Veränderung des Proteoms untersucht. Mithilfe der Massenspektrometrie und einer Isotopenmarkierungsstrategie wurden Proteine von verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* relativ zu einander quantifiziert. Es konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die zu spezifischen Zeitpunkten des Lebenszyklus hoch- oder herabreguliert werden. Folglich sind diese Proteine wahrscheinlich an Prozessen beteiligt, die an den spezifischen Zeitpunkten ablaufen, wodurch diese Hinweise zur weiteren Aufklärung der Lebensweise von *B. bacteriovorus* liefern können.

Die größten Unterschiede im Proteinmuster gab es zwischen der Angriffsphase und der Wachstumsphase, während innerhalb der Wachstumsphase nur geringfügige Unterschiede festgestellt wurden. So konnte beobachtet werden, dass in der Angriffsphase einige Proteine herabreguliert sind, die mit der Proteinexpression bzw. der Adenosintriphosphatsynthese im Zusammenhang stehen. Weiterhin wurde bestätigt, dass sich junge Zellen der Angriffsphase insbesondere in ihrem ribosomalen Proteinmuster deutlich von regulären Zellen der

Angriffsphase unterscheiden, womit die Angriffsphase eigentlich aus zwei Phasen besteht. Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse und eines Vergleiches mit Transkriptionsdaten wurde die Vermutung aufgestellt, dass *B. bacteriovorus* Proteine, welche spezifisch für die Angriffsphase sind, bereits während der Wachstumsphase synthetisiert, wo infolge des Wirtes ein Substrat- und Nährstoffüberschuss vorliegt.

Im Zusammenhang mit der Forschung an *B. bacteriovorus* konnten auch neue Impulse bezüglich der auf Metallmarkierung basierenden massenspektrometrischen Proteinquantifizierung angestoßen werden. Die *Metal-coded affinity tagging* (MeCAT)-Strategie macht Proteine für die Quantifizierung mittels induktiv-gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) zugänglich. In dieser Arbeit wurde unter anderem ein MeCAT-Reagenz mit Acrylamidfunktionalität entwickelt, welches erfolgreich als interner Standard für die Laserablation-ICP-MS von Polyacrylamidgelen verwendet werden kann. Dadurch lassen sich die Qualität der Ablationsbilder und die relative Proteinquantifizierung deutlich verbessern. Durch die Anwendung auf eine Probe von *B. bacteriovorus* konnte gezeigt werden, dass sich mithilfe des internen Standards auch die relative Quantifizierung von komplexen Proteinproben verbessern lässt, wodurch dieser künftig für die Analyse des Proteoms von *B. bacteriovorus* genutzt werden könnte.

Abstract

Due to the excessive use of antibiotics, more and more pathogenic bacteria have become resistant to antibiotics in the last years. These multidrug-resistant microbes are increasingly challenging the healthcare systems. A potential alternative to conventional antibiotics are predatory bacteria. These gram-negative bacteria actively hunt other bacteria, using them for their own metabolism and reproduction. *Bdellovibrio bacteriovorus*, a representative of the predatory bacteria, has a biphasic life cycle consisting of an attack phase in which it actively hunts other gram-negative bacteria, and a growth phase in which it nestles in the periplasmic space of a prey cell and uses its cytoplasm as a substrate for its own reproduction.

For future application of *B. bacteriovorus* as an antibiotic, it is necessary to understand the processes that occur during the life cycle. Therefore, it is essential to elucidate changes of the gene and protein expression during the life cycle. While there are already extensive studies on the genome and the transcriptome of *B. bacteriovorus*, almost no information has been obtained regarding the proteome yet, especially considering changes during the life cycle. Hence, the variations of the proteome were investigated in this work. Using mass spectrometry and an isotopic labelling strategy, proteins from different time points in the life cycle of *B. bacteriovorus* were quantified relatively to each other. Numerous proteins were identified that are up- or down-regulated at specific time points in the life cycle. Accordingly, these proteins are likely to be involved in processes that occur at the specific time and thus provide clues for further clarification of the lifestyle of *B. bacteriovorus*.

The largest differences in protein pattern existed between the attack phase and the growth phase, whereas only minor differences occurred within the growth phase. For instance, several proteins that appear to be down-regulated during the attack phase are related to protein expression or adenosine triphosphate synthesis. Furthermore, it was confirmed that young cells of the attack phase, especially in their ribosomal protein pattern, differ significantly from regular cells of the attack phase. Therefore, the attack phase actually consists of two phases. Based on the results obtained and on a comparison with transcription data, it was suggested that attack phase specific proteins of *B. bacteriovorus* are already synthesized during the growth phase, when there is a substrate and nutrient excess due to the prey.

In connection with the research on *B. bacteriovorus*, new impulses regarding the metal-tag based protein quantification with mass spectrometry could be initiated. The metal-coded affinity tagging strategy (MeCAT) makes proteins accessible for the quantification with inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In this work, a MeCAT reagent with acrylamide functionality was developed, which can be used successfully as an internal standard for laser ablation ICP-MS of polyacrylamide gels. The standard considerably improves the quality of the ablation images as well as the relative protein quantification. Based on the application to a sample of *B. bacteriovorus*, it was demonstrated that the internal standard can also be used to improve the relative quantification of complex protein samples, which could be utilized for the analysis of the *B. bacteriovorus* proteome in the future.

Inhalt

1	Zielstellung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	Antibiotikaresistenzen.....	2
2.2	Alternativen zu Antibiotika	3
2.3	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	7
2.4	Probenvorbereitung für die Proteinanalytik.....	11
2.5	Massenspektrometrische Analyse	12
2.6	Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie	14
2.7	Quantitative Proteinanalytik	19
3	Ergebnisse	25
3.1	Optimierung der Lyse	25
	pH-Wert der Lyse	25
	Pufferion der Lyse	26
	Lysemethode.....	27
3.2	Optimierung der MeCAT-Markierungsreaktion.....	30
	Puffer der Markierungsreaktion	30
	pH-Wert der Markierungsreaktion	32
	Einfluss von Detergenzien auf die Markierungsreaktion.....	33
	Verbesserung der Markierungsreaktion.....	34
3.3	Vorstellung der <i>B. bacteriovorus</i> Proben	39
3.4	Analyse der Proben mit MeCAT	40
3.5	Analyse der Proben mit ICPL	42
	Anwendung von ICPL auf Peptidebene.....	44
	Entwicklung einer Strategie zur Datenauswertung	46
	Quantifizierungsergebnisse von <i>B. bacteriovorus</i>	52

Quantifizierungsergebnisse von <i>E. coli</i>	57
3.6 Erweiterung der <i>B. bacteriovorus</i> Proben.....	60
Analyse der neuen Proben.....	61
Quantifizierungsergebnisse von <i>B. bacteriovorus</i>	63
Quantifizierungsergebnisse von <i>E. coli</i>	70
3.7 Vergleich der regulierten Proteine in beiden Probensätzen	74
3.8 Entwicklung eines neuen MeCAT-Reagenzes	81
Reagenzsynthese und Markierungsexperimente	82
Alternatives Anwendungsgebiet des Reagenzes	83
Validierung des internen Standards	85
Anwendung des Standards auf die <i>B. bacteriovorus</i> Probe	93
4 Diskussion und Ausblick.....	96
4.1 Vergleich der Proteomikdaten mit Transkriptionsdaten	96
4.2 Perspektiven in der Proteinanalytik von <i>B. bacteriovorus</i>	100
4.3 Perspektiven der lanthanoidbasierten Quantifizierung.....	101
4.4 Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse	104
5 Materialien und Methoden	106
5.1 Chemikalien.....	106
5.2 Methoden.....	109
Synthese von MeCAT-Reagenzien	109
Gelelektrophorese	110
SCX	111
Lyseoptimierung an <i>E. coli</i>	114
Optimierung der MeCAT-Reaktion	116
Lyse der <i>B. bacteriovorus</i> Proben	118
Anwendung von MeCAT-IA auf die <i>B. bacteriovorus</i> Proben.....	119

	ICPL-Markierung der <i>B. bacteriovorus</i> Proben auf Proteinebene	121
	ICPL-Markierung der <i>B. bacteriovorus</i> Proben auf Peptidebene.....	122
	Proteinmarkierung durch MeCAT mit NHS-Esterfunktionalität	123
	Datenauswertung	125
	Anwendung des internen Standards auf Modellproteine	134
	Anwendung des internen Standards auf <i>B. bacteriovorus</i> Proben	137
6	Abkürzungsverzeichnis	138
7	Literaturverzeichnis	141
8	Anhang.....	149

1 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Lebenszyklus auf das Proteom von *Bdellovibrio bacteriovorus* zu untersuchen. Dazu sollten Proteinproben von verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus relativ zueinander quantifiziert werden. Die komplexen Proteingemische werden zunächst aus den Zellen extrahiert und über diverse Trennverfahren hinreichend aufgetrennt. Die Quantifizierung sollte anschließend massenspektrometrisch mithilfe einer Proteinmarkierungsstrategie erfolgen. Im Zusammenhang mit der Arbeit an *B. bacteriovorus* wurde darüber hinaus auch angestrebt, die *Metal-coded affinity tagging* (MeCAT)-Strategie weiterzuentwickeln, um ihr Anwendungsgebiet zu erweitern.

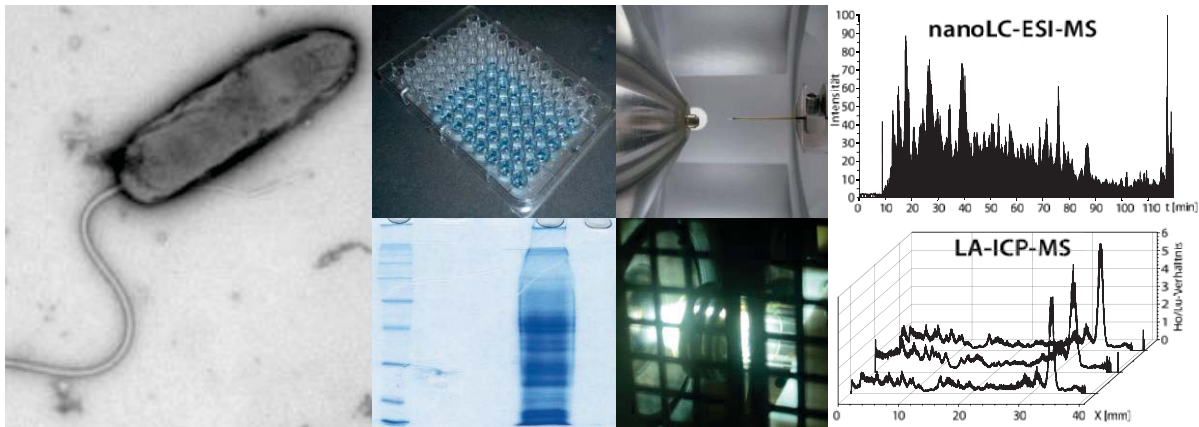


Abb. 1: Konzept für die massenspektrometrische Analyse des Proteoms von *B. bacteriovorus*. Proteinproben von verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* werden prozessiert und aufgetrennt. Über eine massenspektrometrische Analyse erfolgt anschließend die Quantifizierung der Proben (Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach ^[1]).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Antibiotikaresistenzen

Ende des 19. Jahrhunderts fragte ein junger Medizinstudent einmal arabische Stalljungen, warum sie Schimmelwachstum auf den Sätteln anregten, indem sie die Sättel in dunklen, feuchten Räumen lagerten. Die Stalljungen hatten beobachtet, dass Reitwunden schneller heilten, wenn auf den Sätteln Schimmel wuchs. Der junge Medizinstudent bereitete daraufhin eine Lösung aus den Schimmelpilzen vor und injizierte sie mehreren mit Typhus infizierten Meerschweinchen. Alle Meerschweinchen überlebten die Erkrankung. Der Medizinstudent, dessen Name ERNEST DUCHESNE (1874-1912) war, führte im Folgenden systematische Experimente mit dem Schimmelpilz durch und reichte im Dezember 1897 seine Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zum Überlebenskampf der Mikroorganismen: Der Antagonismus von Schimmelpilzen und Mikroben“ (franz. „*Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes: antagonisme entre les moisissures et les microbes*“) ein. Jedoch fand seine Arbeit aufgrund seines jungen Alters und geringer Bekanntheit keine größere Beachtung in der wissenschaftlichen Gemeinschaft.^[2, 3] Es sollte mehr als 30 Jahre dauern, bis ALEXANDER FLEMING (1881-1955) in vergessenen Petrischalen mit *Staphylococcus*-Kulturen die antibakterielle Wirkung von Schimmelpilzen erneut beobachtete und daraufhin das Penicillin isolierte.^[4] Diese Entdeckung leitete eine medizinische Revolution ein. Durch die Entwicklung von Antibiotika konnten pathogene Erreger, deren Bekämpfung bisher auf eine symptomatische Behandlung beschränkt war, nun erstmals auch aktiv bekämpft werden.

In den letzten Jahren konnte jedoch das vermehrte Auftreten von antibiotikaresistenten Pathogenen beobachtet werden. Der exzessive Gebrauch von Antibiotika nicht nur in der Medizin, sondern insbesondere auch in Bereichen wie der kommerziellen Tierzucht^[5] hat dazu geführt, dass die Pathogene zunehmend Resistenzen gegen Antibiotika, auf die sie vormals ansprachen, ausbilden. Aufgrund der zunehmenden Brisanz und Verbreitung der Resistenzen wurde im Jahr 2012 von einem breiten Autorenkollektiv ein Klassifizierungssystem für die Ausprägung der Antibiotikaresistenzen eingeführt^[6]. Demnach unterscheidet man zwischen MDR (engl. *multidrug-resistant*), XDR (engl. *extensively drug-resistant*) und PDR (engl. *pandrug-resistant*). Ein MDR-Pathogen hat jeweils Resistenzen

gegen mindestens ein Antibiotikum aus drei verschiedenen Antibiotikaklassen ausgebildet. Bei XDR spricht der Erreger noch gegen Antibiotika aus höchstens zwei Klassen an und bei PDR hat sich eine Resistenz gegen sämtliche bekannten Antibiotika entwickelt. Von dem XDR-Pathogenen des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis* konnten bis 2015 bereits Fälle in 117 Ländern nachgewiesen werden^[7]. PDR hat sich insbesondere bei mittlerweile pandemischen Stämmen von *Staphylococcus aureus* ausgebildet. So führte die Infektion mit MRSA (engl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) allein in den USA zu geschätzt 19.000 Todesfällen im Jahr 2005^[8]. Darüber hinaus konnte PDR auch bei den gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* beobachtet werden^[9]. Gerade aufgrund von PDR-Pathogenen ist es essenziell, neue Strategien zur Bekämpfung von pathogenen Bakterien zu entwickeln.

2.2 Alternativen zu Antibiotika

Aufgrund der zunehmenden Resistenzen gegen klassische Antibiotika wurden einige alternative Ansätze entwickelt, wie pathogene Bakterien künftig bekämpft werden könnten. Einen guten Überblick über die verschiedenen Ansätze bietet der Artikel von ALLEN *et al.* von 2014^[10]. Als ein Lösungsvorschlag wird hier das Impfen genannt, da Impfungen sehr spezifisch sind und in der Regel guten Schutz sowohl gegen Bakterien als auch gegen Viren bieten. Da für einen effektiven Schutz jedoch möglichst die gesamte Population geimpft werden müsste, wäre ein vollständiger Ersatz der Antibiotika mit Impfstoffen auch aufgrund der Vielzahl an Pathogenen sehr kostspielig. Außerdem gibt es viele Pathogene, für die kein Impfstoff bekannt ist. Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von probiotischen Kulturen, um so entweder das Immunsystem zu stärken oder das Pathogen zu verdrängen und eine Besiedlung zu verhindern^[11].

Eine weitere Alternative zu klassischen Antibiotika ist der Einsatz von Bacteriocinen. Diese von Bakterien sekretierten Peptide und Proteine mit antibiotischer Wirkung schützen eine Kultur vor der Besiedlung durch andere Stämme ähnlicher Bakterienarten. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu 99 % aller Bakterien mindestens ein Bacteriocin produzieren. Obschon Bacteriocine im Vergleich zu klassischen Antibiotika eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit haben, Resistenzen auszulösen, konnten in *in vitro*-Langzeitexperimenten bereits Resistenzen beobachtet werden^[12]. Neben Bacteriocinen könnten auch Endolysine als

Antibiotika eingesetzt werden^[13]. Diese Hydrolasen werden von Bakteriophagen hergestellt um mit hoher Spezifität die Peptidoglycanschicht von Bakterien aufzulösen. Dadurch beschränkt sich die Anwendung jedoch auf gram-positive Pathogene.

Über den Einsatz von Lysinen hinaus wird auch über den direkten Einsatz von Bakteriophagen als Antibiotikum nachgedacht. Bereits 1917 wurden erste Experimente zum erfolgreichen Einsatz von Phagen gegen pathogene Bakterien durchgeführt^[14]. Mit dem Aufkommen von Penicillin und anderer Antibiotika wurde die therapeutische Phagenforschung jedoch weitgehend verdrängt. Bakteriophagen besitzen eine sehr große Wirtsspezifität, was einen Einsatz als Breitbandantibiotikum sehr schwierig macht. Andererseits wird dadurch die natürliche bakterielle Flora weniger gestört und Resistenzbildungen sind deutlich unwahrscheinlicher als bei klassischen Antibiotika. Darüber hinaus könnten Phagen bereits resistent gewordene Pathogene durch Mutation ihrerseits erneut angreifen^[5]. Die hohen Mutationsraten könnten sich jedoch auch als problematisch für eine stabile Anwendung erweisen^[14].

Die letzte Gruppe an potentiellen Antibiotikaalternativen sind prädatorische Bakterien (engl. *predatory bacteria*). Diese gram-negativen Bakterien jagen andere Bakterien, wobei sie das Zytoplasma ihres Wirtes zersetzen und für den eigenen Stoffwechsel und die eigene Reproduktion verwenden. Prädatorische Bakterien konnten erstmals 1962 aus einer Bodenprobe isoliert werden^[15]. Aufgrund seiner Form und seiner Lebensweise gaben STOLP *et al.* dem neuentdeckten Bakterium den Namen *Bdellovibrio bacteriovorus*. Mit der Zeit konnten immer mehr prädatorische Bakterien aus diversen Lebensräumen isoliert werden. So konnten prädatorische Bakterien in fast allen Lebensräumen gefunden werden, sei es in – sowohl süßwasser- als auch salzwasserhaltigen – Gewässern^[16, 17] oder im Darm von Mensch^[18] und Tier^[19]. Abgesehen von dem 1972 isoliertem Cyanobakterium *Vampirovibrio chlorellavorus*^[20], welches Grünalgen der Gattung *Chlorella* jagt, jagen sämtliche bisher identifizierten prädatorischen Bakterien ausschließlich gram-negative Bakterien^[21]. Jedoch konnte 2014 von IEBBA *et al.* erstmals beobachtet werden, dass ein Stamm von *B. bacteriovorus* sich durch das gram-positive Bakterium *S. aureus* vermehren konnte^[22]. Darüber hinaus konnten auch die extrazellulären Proteasen von *B. bacteriovorus* dazu genutzt werden, Biofilme vom gram-positiven *S. aureus* zu zersetzen^[23]. Ursprünglich wurden sämtliche isolierten prädatorischen Bakterien der Spezies *B. bacteriovorus* zugeordnet. Mit

der Weiterentwicklung der genetischen Analysenmethoden konnten weitere prädatorische Spezies zugeordnet werden, die durch konvergente Evolution entstanden sind^[24]. In Abbildung 2 ist ein aktueller phylogenetischer Stammbaum für eine Auswahl der bisher identifizierten prädatorischen Bakterien dargestellt^[21].

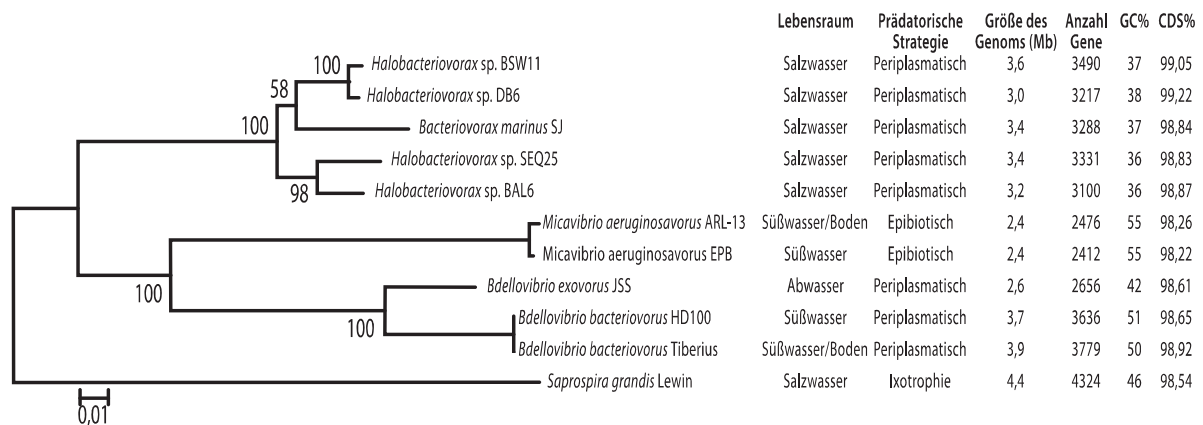


Abb. 2: Auf 16S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) basierender phylogenetischer Stammbaum von verschiedenen Spezies prädatorischer Bakterien. Darüber hinaus wurden die Spezies bezüglich ihres Lebensraums, ihrer Lebensweise und ihrer genetischen Kenngrößen verglichen. GC beschreibt den Gehalt an Guanin und Cytosin und CDS den Anteil der codierenden DNA^[21].

Die Proteobakterien unter den prädatorischen Bakterien (Genera *Bdellovibrio*, *Bacteriovorax* und *Micavibrio*) werden zur Vereinfachung meist unter dem Begriff BALOs (engl. *Bdellovibrio-and-like organisms*) zusammengefasst^[25]. Einer der großen Vorteile von BALOs gegenüber Bakteriophagen neben den geringeren Mutationsraten ist, dass diese in der Lage sind, Biofilme zu zerstören^[26]. Durch die relativ große Geschwindigkeit, mit der BALOs ihren Wirt töten, ist es für den Wirt schwierig, eine genetische Antwort zur Abwehr des Angreifers und damit Resistenzen zu entwickeln^[27]. Es konnte für *E. coli* zu Beginn der Attacke durch *B. bacteriovorus* zwar eine transkriptomische Antwort beobachtet werden, jedoch enthielt diese Antwort fast ausschließlich stressinduzierte Gene und keine spezifischen Abwehrmechanismen^[28]. In Langzeitexperimenten wurde 2009 für *Pseudomonas fluorescens* erstmals beobachtet, wie sich bei einem Wirt Resistenzen gegen *B. bacteriovorus* ausbilden^[29]. BALOs bieten jedoch wie Phagen das Potential, dass sie resistent gewordene Wirte durch Evolution ihrerseits erneut angreifen können. So konnte im Langzeitexperiment beobachtet werden, dass ein Teil der resistent gewordenen *P. fluorescens* Zellen durch Koevolution weiterhin von *B. bacteriovorus* gejagt werden konnte.

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Untersuchungen bezüglich der potentiellen Anwendung von BALOs als Antibiotika. Um eine eventuelle Pathogenität von BALOs auf eukaryotische Organismen zu überprüfen, wurden BALOs in mehreren in-vivo Experimenten auf Tiermodelle (unter anderem Maus^[30], Ratte^[31-33] und Kaninchen^[34]) und in in-vitro Experimenten auf menschliche Zelllinien^[35, 36] angewendet. Abgesehen von einer temporären leichten Entzündungsreaktion konnten keine negativen Effekte beobachtet werden. Bei intravenöser Anwendung konnten BALOs innerhalb weniger Tagen nicht mehr nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten bei Anwendung auf infizierte Tiere positive Effekte beobachtet werden. Beispielsweise führte 2011 die erstmalige orale Anwendung von *B. bacteriovorus* auf mit *Salmonella enterica* infizierte Hühner zu verringerten Pathogenzahlen und weniger Symptomen^[37]. Die respiratorische Applikation auf mit *Klebsiella pneumoniae* infizierte Ratten führte zu einer Reduktion der Pathogenlast in den Lungen von drei Größenordnungen^[31]. Neben der Wirkung auf den Organismus wurde neuerdings insbesondere das pathogene Beutespektrum von BALOs untersucht. In in-vitro Studien konnten zahlreiche Pathogene als Beute von BALOs identifiziert werden. Zu diesen gehören beispielsweise die okularen Pathogene *Pseudomonas aeruginosa* und *Serratia marcescens*^[38] oder auch das Parodontitispathogen *Aggregatibacter actinomycetem-comitans*^[39]. Zusammen mit der Fähigkeit von BALOs, Biofilme zu zersetzen, könnte dies für eine künftige Anwendung im Mundraum sprechen. Darüber hinaus wurde insbesondere der Effekt von BALOs auf MDR-Pathogene untersucht. Bereits in mehreren in-vitro Studien, bei denen BALOs auf MDR- und auf XDR-Pathogene angewendet wurde, konnte kein negativer Einfluss durch die Antibiotikaresistenz festgestellt werden^[40-42], weder bezüglich der Fähigkeit, die Pathogene zu jagen noch bezüglich der Fähigkeit, Biofilme der Pathogene aufzulösen.

Jedoch wurden in Experimenten auch einige Schwierigkeiten identifiziert, die einen erfolgreichen Einsatz als Antibiotika behindern könnten. Bereits in in-vitro Experiment konnte beobachtet werden, dass die Jagdeffizienz von BALOs in komplexeren Proben, wie z. B. menschlichem Speichel, deutlich abnahm^[43, 44]. Darüber hinaus konnte ein inhibierender Effekt von Indol auf die Prädation festgestellt werden, was eine intestinale Anwendung einschränken könnte^[45]. Auch hohe Osmolalitäten können inhibierend auf BALOs wirken. Obwohl BALOs nicht anfällig gegenüber dem Komplementsystem im Blutplasma sind, kann

die Prädation dennoch durch Serumalbumin vollständig inhibiert werden, indem die BALOs ummantelt werden^[46]. Diese beiden Effekte machen eine intravenöse Anwendung von BALOs schwierig. Vermutlich aus diesen Gründen konnte 2017 bei einer intravenösen Applikation von BALOs auf mit *K. pneumoniae* infizierten Ratten kein Effekt festgestellt werden^[32].

Über die medizinische Anwendung hinaus konnten noch weitere potentielle Anwendungsgebiete für BALOs gefunden werden, wie beispielsweise in der Abwasseraufbereitung^[47]. Auch über eine industrielle Anwendung, wie in der Gewinnung von Bioprodukten, wird mittlerweile nachgedacht. So konnte 2016 mithilfe von *B. bacteriovorus*, bei dem die Polyhydroxyalkanoatdepolymerase ausgeschaltet war, Polyhydroxyalkanoat aus *Pseudomonas putida* und *Cupriavidus necator* gewonnen werden^[48].

2.3 *Bdellovibrio bacteriovorus*

Da in dieser Arbeit mit *B. bacteriovorus* gearbeitet wurde, soll diese Spezies im Folgenden noch näher vorgestellt werden. Innerhalb der BALOs ist *B. bacteriovorus* die am besten untersuchte Spezies. *B. bacteriovorus* besitzt einen zweiphasigen Lebenszyklus. Das vollständige Genom des HD100 Stamms von *B. bacteriovorus* konnte 2004 von RENDULIC *et al.* entschlüsselt werden^[49]. In Abbildung 3 ist der Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* dargestellt.

Zu Beginn des Lebenszyklus befindet sich *B. bacteriovorus* in der Angriffsphase (AP, engl. *attack phase*) aktiv auf der Suche nach potentiellen Wirten (Vgl. Abb. 4 A). Mit seinem einzelnen Flagellum bewegt es sich dabei mit der höchsten bekannten Geschwindigkeit aller gram-negativen Bakterien. Es ist noch nicht abschließend geklärt, wie *B. bacteriovorus* potentielle Wirte findet, während es sich durch das Medium bewegt. Allerdings wird vermutet, dass dies statistisch durch zufällige Zusammenstöße geschieht, welche durch hydrodynamische Effekte verstärkt werden^[50]. Stößt *B. bacteriovorus* mit einem potentiellen Wirt zusammen, haftet es sich an die äußere Membran des Wirts. Auch hier ist noch nicht genau geklärt, wie *B. bacteriovorus* erkennt, ob die Zelle als Wirt geeignet ist. Es konnte beispielsweise beobachtet werden, dass *B. bacteriovorus* die Membran der Wirtszelle wieder verlässt, wenn der Wirt bereits durch eine andere *B. bacteriovorus* Zelle belegt ist. Es wird allerdings vermutet, dass der Initiator der Penetration eine Komponente der Wirtsmembran ist^[51].

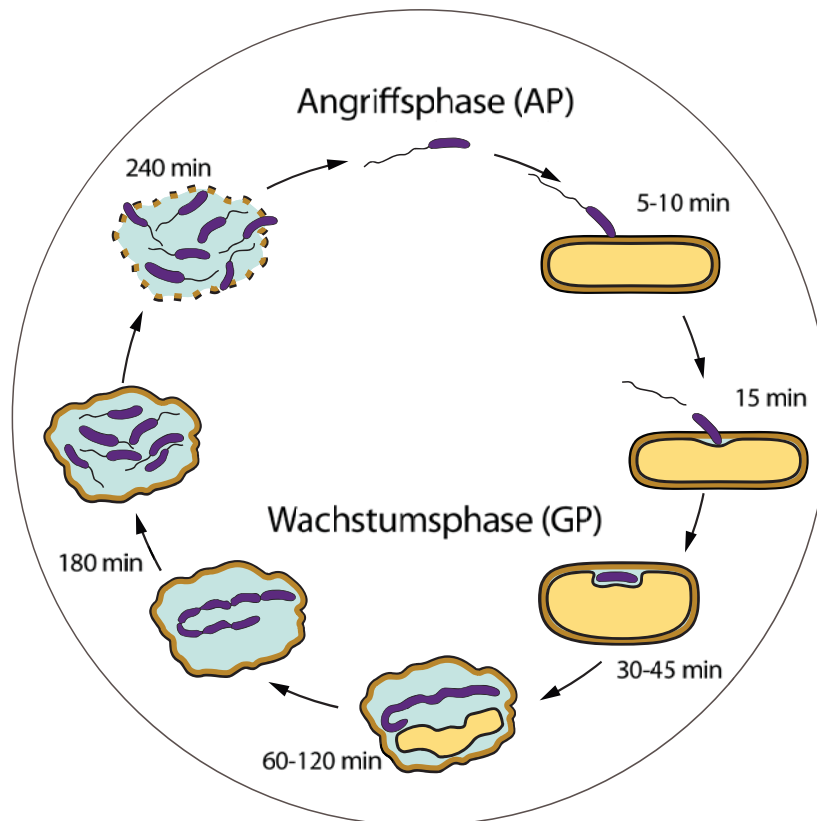


Abb. 3: Lebenszyklus von *B. bacteriovorus*. In der Angriffsphase bewegt sich *B. bacteriovorus* auf der Suche nach potentiellen Wirten. Trifft es auf einen Wirt, dringt es in den periplasmatischen Raum des Wirts ein und initiiert die Wachstumsphase. *B. bacteriovorus* nutzt das Zytoplasma des Wirts für das eigene Wachstum. Anschließend teilt sich *B. bacteriovorus* in mehrere neue Zellen, welche den Wirt verlassen und sich ihrerseits neue Wirte suchen. Die Zeitangaben basieren auf Untersuchungen zum Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* HD100 mit *E. coli* S17-1 als Wirt^[52].

Erachtet *B. bacteriovorus* die Wirtszelle als geeignet, dringt es in den periplasmatischen Raum des Wirts ein. Während dieses Prozesses verliert *B. bacteriovorus* sein Flagellum. Das Eindringen in die Wirtszelle erfolgt vorrangig mithilfe von Typ IV Pili (Vgl. Abb. 4 A und B), daher sind die assoziierten Gene vor der Penetration hochreguliert^[53]. Nach der Penetration wechselt *B. bacteriovorus* in die Wachstumsphase (GP, engl. *growth phase*). Mithilfe von Glycanasen hydrolysiert *B. bacteriovorus* anschließend die Peptidoglycanschicht des Wirts, wodurch die Wirtszelle – nun Bdelloplast genannt – eine sphärische Form annimmt (Vgl. Abb. 4 C). Hierauf initiiert *B. bacteriovorus* die Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die Biopolymersynthese, wobei es das Zytoplasma des Wirts als Substrat verwendet. Basierend auf den genetischen Daten konnte ein horizontaler Gentransfer vom Wirt zu *B. bacteriovorus* ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte auch kein Transfer von Lipopolysacchariden^[51] und Membranproteinen^[54] beobachtet werden, wodurch eine

Übernahme von intakten Wirtsbiopolymeren eher ausgeschlossen werden kann. Infolge der Biosynthese wächst die *B. bacteriovorus* Zelle zu einem Filament. Sobald das Zytoplasma des Wirts aufgebraucht ist, spaltet sich das Filament in mehrere neue *B. bacteriovorus* Zellen. Die Anzahl der neugebildeten Zellen hängt von der Größe des Wirts ab. Die neugebildeten Zellen zersetzen Teile der äußeren Membran des Wirts und verlassen mithilfe von neugebildeten Flagellen den Wirt. Anschließend wechseln sie erneut in die AP, wobei die leere Hülle des Wirts zurückbleibt (Vgl. Abb. 4 D).

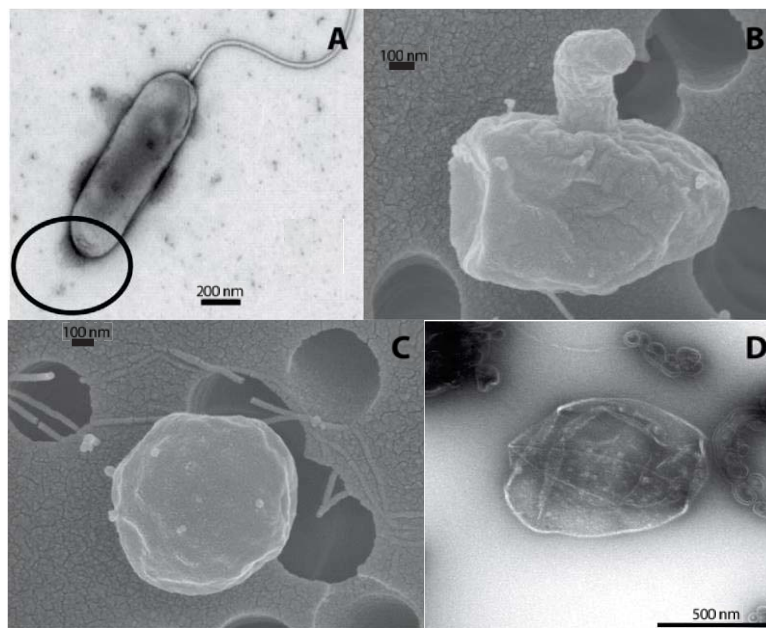


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Stadien des Lebenszyklus. **A:** Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme von AP Zellen. Im eingekreisten Bereich sind Pili erkennbar (Abbildung nach ^[55]). **B:** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der Penetration von *E. coli* durch *B. bacteriovorus*. **C:** REM Aufnahme des Bdelloplasten. **D:** TEM Aufnahme der leeren Hülle des Wirts nach Verlassen der neugebildeten AP Zellen (Abbildung B, C und D nach ^[56]).

Basierend auf den genetischen Daten konnten für *B. bacteriovorus* HD100 sechs σ -Faktoren vorhergesagt werden. σ -Faktoren sind Proteine, die an die RNA-Polymerase binden, um die Transkription zu initiieren. Bakterien besitzen in der Regel mehrere σ -Faktoren, die mit unterschiedlichen Promotoreregionen der DNA wechselwirken können. Auf diese Weise sind Bakterien in der Lage, ihre Transkription an Umwelteinflüsse anzupassen. Für *E. coli* sind sieben σ -Faktoren bekannt (σ^{70} , σ^{54} , σ^{38} , σ^{32} , σ^{28} , σ^{24} und σ^{FecI})^[57]. Von den sechs σ -Faktoren von *B. bacteriovorus* weisen zwei (Bd0242, Bd3314) zu σ^{70} , einer (Bd0843) zu σ^{54} , einer (Bd3318) zu σ^{28} und zwei (Bd0881, Bd0743) zu σ^{24} Homologien auf^[58]. Die hier verwendete Nomenklatur mit Bd und einer Zahl (z. B. Bd0242) beschreibt den zum Protein gehörenden

Genlokus, d. h. wo sich das Gen, welches das Protein codiert, auf dem Chromosom befindet. 2013 konnte von KARUNKER *et al.* nachgewiesen werden, dass die meisten Gene entweder ausschließlich in AP oder in GP exprimiert werden^[59]. Das σ^{28} Homolog Bd3318 konnte als AP-spezifischer σ -Faktor identifiziert werden, welches an 140 AP-exklusive Promotoren bindet. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass während der AP große Mengen von nichtcodierender RNA exprimiert werden, welche einen c-di-GMP (engl. *cyclic diguanylate monophosphate*) Riboswitch enthalten. Daraus wurde geschlossen, dass c-di-GMP vermutlich wichtig für den schnellen Wechsel zwischen AP und GP ist. Die Wichtigkeit von c-di-GMP konnte ebenfalls durch die Gruppe um SOCKETT bestätigt werden, welche einerseits genetische Experimente mit den potentiell mit c-di-GMP interagierenden Proteinen durchführten^[60] und andererseits die für die c-di-GMP Synthese relevanten Gene untersuchten^[61]. Durch Ausschalten der jeweiligen Gene konnte nachgewiesen werden, dass c-di-GMP essentiell für zahlreiche Prozesse in *B. bacteriovorus* ist. Neben der Prädation umfasst dies auch die gleitende Fortbewegung (engl. *gliding motility*) und den Übergang zwischen einer zwingend prädatorischen (PD, engl. *prey-dependent*) und einer nicht-prädatorischen (PI, engl. *prey-independent*) Lebensweise. Obwohl *B. bacteriovorus* eine obligatorisch prädatorische Lebensweise hat, lassen sich in Nährmedien mit hoher Zelldichte PI Mutanten isolieren^[62].

Die Grundlagenforschung zu *B. bacteriovorus* hat sich bisher fast ausschließlich auf Analysen der genetischen Expression, d. h. auf Analysen des Genoms und des Transkriptoms, gestützt. Für eine Aufklärung der Mechanismen, die *B. bacteriovorus* seine einzigartige Lebensweise ermöglichen, sind jedoch auch Analysen des Proteoms notwendig. Das Proteom spiegelt auf dynamische Art und Weise sowohl das Genom als auch Umwelteinflüsse wider^[63]. So sind es meist Proteine, die bei den verschiedenen Prozessen in einer Zelle eine zentrale Rolle spielen. 2008 wurde von DORI-BACHASH *et al.* erstmals eine qualitative Analyse der Proteine eines PI Stammes durchgeführt^[64]. Es konnten 21 % der vorhergesagten Proteine identifiziert werden, wobei der Fokus insbesondere auf Proteine mit variierender Genexpression lag. Davon abgesehen wurde bisher noch keine umfangreiche Proteinanalyse von PD Zellen durchgeführt, geschweige denn eine quantitative Analyse von unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus. Um diese Aufgabe zu bewältigen, werden diverse Techniken und Methoden benötigt, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

2.4 Probenvorbereitung für die Proteinanalytik

Die Massenspektrometrie (MS) hat sich als Methode der Wahl zur Analyse von Proteinen etabliert. In der MS-basierten Proteinanalytik wird zwischen *Top-Down*- und *Bottom-Up*-Ansätzen unterschieden^[65]. Bei *Top-Down*-Ansätzen werden intakte Proteine massenspektrometrisch analysiert, wobei die Identifizierung über Fragmentierungsexperimente erfolgt. Dies bietet unter anderem den Vorteil, dass Mutationen und Modifikation leichter nachgewiesen werden können. Bei *Bottom-Up*-Ansätzen werden die Proteine vor der Analyse mithilfe von Proteasen in Peptide aufgespalten, was einerseits eine höhere Empfindlichkeit und andererseits weniger Probleme mit der Ionisierbarkeit bietet. Unabhängig vom Analysenansatz müssen biologische Proben aufgrund ihrer Komplexität in der Regel zunächst aufgetrennt werden.

Bei *Bottom-Up*-Ansätzen werden die Proteine häufig durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Einen guten Überblick über die Techniken der Gelelektrophorese bietet das Review von RIGHETTI aus dem Jahr 2005^[66]. Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese wird meist die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet. Das Tensid SDS lagert sich mit seiner unpolaren Gruppe an die entfalteten Proteine an. Dadurch wird die gelelektrophoretische Trennung im elektrischen Feld abhängig von der Größe der Proteine und fast sequenzunabhängig. Bei diskontinuierlichen Gelen lässt sich die Trennleistung durch eine Aufkonzentrierung der Proteine in einem Sammelgel noch weiter verbessern. Das Sichtbarmachen der getrennten Proteine erfolgt in der Regel durch Silber^[67] oder durch Coomassie Brilliantblau, einer Gruppe von organischen Farbstoffen^[68].

Für die weitere Prozessierung und spätere Analyse müssen die sichtbargemachten Proteine aus dem Gel herausgelöst werden. Es haben sich verschiedene Methoden entwickelt, wie dies erfolgreich umgesetzt werden kann^[69]. Für die Analyse im *Bottom-Up*-Ansatz hat es sich etabliert, die Proteine mittels einer Protease direkt in der Gelmatrix zu proteolysieren und die entstehenden Peptidfragmente anschließend zu eluieren. Als Protease wird meist die Serinprotease Trypsin verwendet, welche Proteine C-terminal zu Arginin und Lysin spaltet^[70]. Die Gründe hierfür liegen einerseits in der günstigen statistischen Verteilung dieser Aminosäuren in Proteinen und andererseits in ihrer hohen Basizität. Dadurch entstehen

bevorzugt Peptide, welche eine günstige Masse für die MS haben und sich leicht ionisieren lassen.

Nach der Proteolyse werden die entstandenen Peptide häufig mithilfe von Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC, engl. *high-performance liquid chromatography*) aufgetrennt. Seit der Einführung der ersten kommerziellen HPLC-Systeme Ende der 1960er Jahre hat sich die Methode kontinuierlich weiterentwickelt^[71]. Damit verbunden konnten die Säulenlängen und die Flussraten zunehmend verringert werden, was einerseits die Trennzeiten verkürzte und andererseits die Kopplung mit MS ermöglichte. Für *Bottom-Up*-Ansätze hat sich insbesondere die nanoLC (engl. *nano-flow HPLC*), d. h. HPLC-Systeme mit Flüssen kleiner 1 µL/min, etabliert. Aus den geringen Flüssen ergeben sich eine relativ einfache Kopplung an das MS und deutlich höhere Sensitivitäten^[72]. Die Trennung erfolgt in der Regel an polaren (Normalphasenchromatografie) oder an unpolaren (Umkehrphasenchromatografie) stationären Phasen. Darüber hinaus wird für Peptidproben als orthogonale Trenntechnik häufig die Ionenaustauschchromatografie in Form der starken Kationenaustauschchromatografie (SCX, engl. *strong cation exchange*) genutzt^[73]. Ein beliebtes Salz für eine MS-kompatible SCX-Trennung ist Ammoniumformiat^[74]. Dieses hat zwar eine etwas geringere Elutionskraft als das gängigere Kaliumchlorid, verdampft allerdings beim Einengen der SCX-Fraktionen vollständig. Ein eventueller Entsalzungsschritt erübrigt sich somit.

2.5 Massenspektrometrische Analyse

Nach der Auftrennung der Protein- und Peptidproben werden diese massenspektrometrisch analysiert. Bei der Massenspektrometrie werden Ionen mithilfe von elektrischen bzw. magnetischen Feldern nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt. Die Ionisierung von Biomolekülen erfolgt in der Regel durch schonende Ionisierungsverfahren wie Matrix-unterstützte Laser-Desorption und Ionisierung (MALDI, engl. *matrix-assisted laser desorption and ionization*) oder Elektrosprayionisierung (ESI). Bei MALDI werden die Analytmoleküle in eine Matrix aus kleinen organischen Molekülen eingebettet und anschließend durch einen Laserpuls desorbiert und ionisiert^[75]. Beim ESI-Prozess wird der gelöste Analyt durch eine Kapillare geleitet, an deren Ausgang ein elektrisches Feld angelegt ist. In Verbindung mit einem Zerstäuber kommt es so zur Bildung kleiner geladener Tropfen.

Während das Lösemittel der Tropfen verdampft, werden Ladungsträger auf den Analyten übertragen, wobei hier verschiedene Mechanismen vermutet werden^[76]. Anders als MALDI, kann ESI direkt (online) an HPLC-Systeme gekoppelt werden, um die getrennten Analyten unmittelbar nach der Trennung zu analysieren. Darüber hinaus werden bei ESI auch höher geladene Ionen gebildet, was insbesondere für die Analyse großer Biomoleküle mit hochauflösenden Massenspektrometern von Vorteil ist. Der ESI-Prozess lässt sich weiterhin durch eine Verkleinerung der Kapillare und damit verbunden der Volumina und Flüsse auch miniaturisieren. Die daraus resultierende nanoESI-Quelle kann direkt an nanoLC-Systeme gekoppelt werden. Darüber hinaus sind die nanoESI-Quellen auch deutlich empfindlicher als andere ESI-Quellen.

Eine weitere häufig genutzte Ionisierungsmethode ist die Ionisierung durch ein induktiv gekoppeltes Plasma (ICP, engl. *inductively coupled plasma*). Bei der ICP-MS wird der Analyt in einem Edelgasplasma, welches durch einen Induktionsstrom erzeugt wird, ionisiert. Durch Plasmatemperaturen im Bereich von mehreren tausend Kelvin zerfallen die Analytmoleküle zunächst in ihre Atome und werden anschließend ionisiert^[77]. Die ICP-MS bietet einen großen linearen Messbereich, eine hohe Sensitivität und niedrige Nachweisgrenzen für viele Elemente^[78]. Aufgrund des Verlustes an strukturellen Informationen infolge der Ionisierung und aufgrund der geringen Empfindlichkeit für Kohlenstoff und andere biologisch relevante Elemente ist die direkte Anwendbarkeit der ICP-MS auf Proteine sehr begrenzt. Sie beschränkt sich daher vor allem auf Metalloproteine und Proteine, die durch ein Metall markiert wurden^[79].

Da infolge der Ionisierung im Plasma ohnehin sämtliche strukturellen Informationen des Analyten verloren gehen, eignet sich die ICP-MS sehr gut für die Kopplung mit der Laserablation (LA). Bei der LA werden Oberflächen mithilfe eines Lasers abgerastert. Das ablatierte Material kann anschließend über einen Edelgasstrom in das ICP geleitet und ionisiert werden. Aus den generierten Daten lässt sich anschließend die Verteilung der relativen Analytabundanzen orts aufgelöst auf der Oberfläche darstellen. Da bei der LA-ICP-MS keine Matrix benötigt wird, lässt sich die Methode auf sehr viele Bereiche anwenden. Die Anwendungen in der Proteinanalytik sind jedoch auch hier aufgrund der fehlenden Strukturinformationen eingeschränkt. So wird die Methode in der Bioanalytik hauptsächlich zur Bestimmung von Metallen in biologischen Geweben verwendet. Darüber

hinaus lassen sich auch mittels Gelelektrophorese getrennte Metallo- oder metallmarkierte Proteine ortsaufgelöst in dem Gel bestimmen^[80, 81].

Nach der Ionisierung werden die Analyten im Massenspektrometer nach ihrem m/z getrennt und detektiert. Für Analyten, die mittels ICP ionisiert wurden, werden vorrangig Quadrupol- und Sektorfeldmassenspektrometer eingesetzt^[82]. Quadrupol- und Sektorfeldanalysatoren zeichnen sich durch ihre Robustheit, eine relativ hohe Geschwindigkeit, einem sehr großen dynamischen Bereich und eine hohe Empfindlichkeit aus. Darüber hinaus sind Quadrupolmassenspektrometer relativ kostengünstig in der Anschaffung, während sich Sektorfeldmassenspektrometer zusätzlich durch ein hohes Massenauflösungsvermögen auszeichnen.

Neben Flugzeitmassenspektrometern, die aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit und ihrem sehr großen Massenbereich insbesondere für die Analyse von Makromolekülen eingesetzt werden, werden für die Peptidanalytik heutzutage hauptsächlich Ionenfallenmassenspektrometer verwendet. Ein großer Vorteil von Ionenfallenmassenspektrometern ist, dass die gefangenen Ionen theoretisch beliebig oft fragmentiert werden können (MS^n). Bei einem einstufigen Fragmentierungsexperiment wird von MS/MS gesprochen. Da die Ionen mithilfe von Feldern gefangen werden, gibt es jedoch Einschränkungen im Massenbereich der messbaren Ionen. Wegen der hohen Massengenauigkeit und -auflösung werden heute bevorzugt Massenspektrometer eingesetzt, die auf Fourier-Transformationen beruhen (FT-MS). Bei FT-MS erfolgt die Detektion durch die Induktionsströme der verschiedenen Ionen. Innerhalb der FT-MS wird zwischen Orbitrapmassenspektrometern und FTICR-MS (engl. *fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*) unterschieden. FTICR-MS haben die höchsten Massenauflösungen von allen MS. Allerdings sind diese sehr kostspielig in der Anschaffung und im Unterhalt. Im Vergleich dazu bieten Orbitrapmassenspektrometer immer noch sehr gute Massenauflösungen bei deutlich geringeren Kosten^[83].

2.6 Proteinidentifizierung mit Massenspektrometrie

Im *Bottom-Up*-Ansatz werden die Proteine identifiziert, indem die aus der Proteolyse entstandenen Peptide fragmentiert werden. Für die Fragmentierung der Peptide wird heutzutage standardmäßig die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID, engl. *collision-induced*

dissociation) eingesetzt. Hierbei werden die Analytionen auf ein Stoßgas beschleunigt, wodurch es infolge der Kollisionen zur Bindungsspaltung in den Analytionen kommt. Diese Fragmente werden anschließend massenspektrometrisch analysiert^[84]. Der Grund, warum diese Technik erfolgreich für die Identifizierung von Proteinen und Peptiden eingesetzt werden kann, ist, dass diese stets nach gleichen Mustern fragmentieren. Bei CID werden vorrangig die Amidbindungen gespalten. Da Peptide meist mehr als eine Amidbindung haben, kommt es je nach gespaltenen Bindung zur Bildung von Fragmentserien, die sich in ihrer Masse jeweils nur um Aminosäurereste unterscheiden. Darüber hinaus können sich die Ladungen nach der Fragmentierung sowohl auf dem *N*-terminalen als auch auf dem *C*-terminalen Fragment befinden, d. h., sowohl *N*-terminal als auch *C*-terminal kommt es zur Bildung der Fragmentserien. Da sich in den Serien benachbarte Fragmente nur um einen Aminosäurerest unterscheiden, können diese Massendifferenzen zur Sequenzierung und damit zur Identifizierung des Peptids und folglich auch des Proteins genutzt werden. In Abbildung 5 ist die Nomenklatur gezeigt, die ROEPSTORFF, FOHLMAN und BIEMANN für die Peptidfragmentserien einführen^[85, 86].

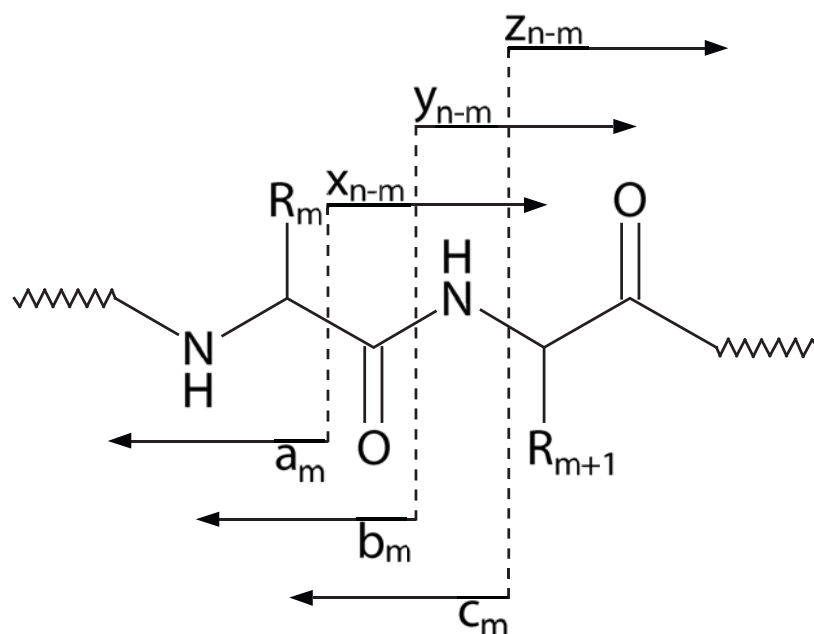


Abb. 5: Peptidfragmentierung nach der Nomenklatur von ROEPSTORFF, FOHLMAN und BIEMANN für ein Peptid aus n Aminosäureresten. Je nach Fragmentierungstechnik bilden sich bevorzugt unterschiedliche Fragmentserien. Bei CID bilden sich bevorzugt *b*- bzw. *y*-Ionen (Abbildung nach ^[85]).

Über die Fragmentserien lassen sich prinzipiell beliebige Proteine sequenzieren. Aufgrund der Vielzahl an Proteinen in komplexen Proteinproben ist eine manuelle Bestimmung jedoch

gerade für große Proteine nicht praktikabel. Daher wurden mit dem Fortschritt in der elektronischen Datenverarbeitung zahlreiche Algorithmen und Programme entwickelt, um die Spektrenauswertung und damit die Proteinidentifizierung zu automatisieren. Mit Ausnahme der *de-novo*-Sequenzierung^[87], nutzen sämtliche Algorithmen Sequenzinformationen aus Onlineproteindatenbanken für die Identifizierung der Proteine. Hierfür wird insbesondere die UniProt^[88]-Datenbank, genutzt.

Die diversen Auswertungsalgorithmen lassen sich prinzipiell vier verschiedenen Klassen zuordnen, die sich jeweils in der Art und Weise unterscheiden, wie die Identifizierung umgesetzt wird. Einen guten Überblick über die vier Arten der Algorithmen bietet das Review von Sadygov *et al.* aus dem Jahr 2004^[89]. Es wird zwischen stochastischen Modellen (engl. *stochastic models*), statistischen und Wahrscheinlichkeitsmodellen (engl. *statistical and probability models*), interpretativen Modellen (engl. *interpretative models*) und beschreibenden Modellen (engl. *descriptive models*) unterschieden. Bei den beiden erstgenannten Modellen basiert die Identifizierung hauptsächlich auf Wahrscheinlichkeitsrechnungen, wobei die stochastischen Modelle vorrangig auf *a priori* Annahmen basieren, während die statistischen und Wahrscheinlichkeitsmodelle hierfür empirische Daten heranziehen. Den statistischen und Wahrscheinlichkeitsmodellen lässt sich beispielsweise Mascot^[90] zuordnen, welcher einer der meist verwendeten Algorithmen für die Proteinidentifizierung ist. Bei den interpretativen Modellen wird zunächst mindestens ein Teil der Peptidsequenz aus den MS/MS-Spektren bestimmt, welche dann über die Datenbankanalyse zur Identifizierung der Proteine genutzt werden kann.

Die letzte Gruppe an Algorithmen sind die beschreibenden Modelle. Diese basieren auf einem Vergleich von theoretischen MS/MS-Spektren mit den experimentellen Spektren. Der SEQUEST Algorithmus, welcher ebenfalls ein weit verbreiteter Algorithmus ist, lässt sich den beschreibenden Modellen zuordnen. Da die Proteinidentifizierung in dieser Arbeit mithilfe von SEQUEST erfolgte, soll dieser Algorithmus im Folgenden näher vorgestellt werden. Der SEQUEST-Algorithmus wurde 1994 von Eng *et al.* entwickelt^[91]. Um eine korrekte Identifizierung sicher zu stellen, arbeitet SEQUEST mit einem mehrstufigen Bewertungssystem. Zur Veranschaulichung ist der Ablauf des Algorithmus in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

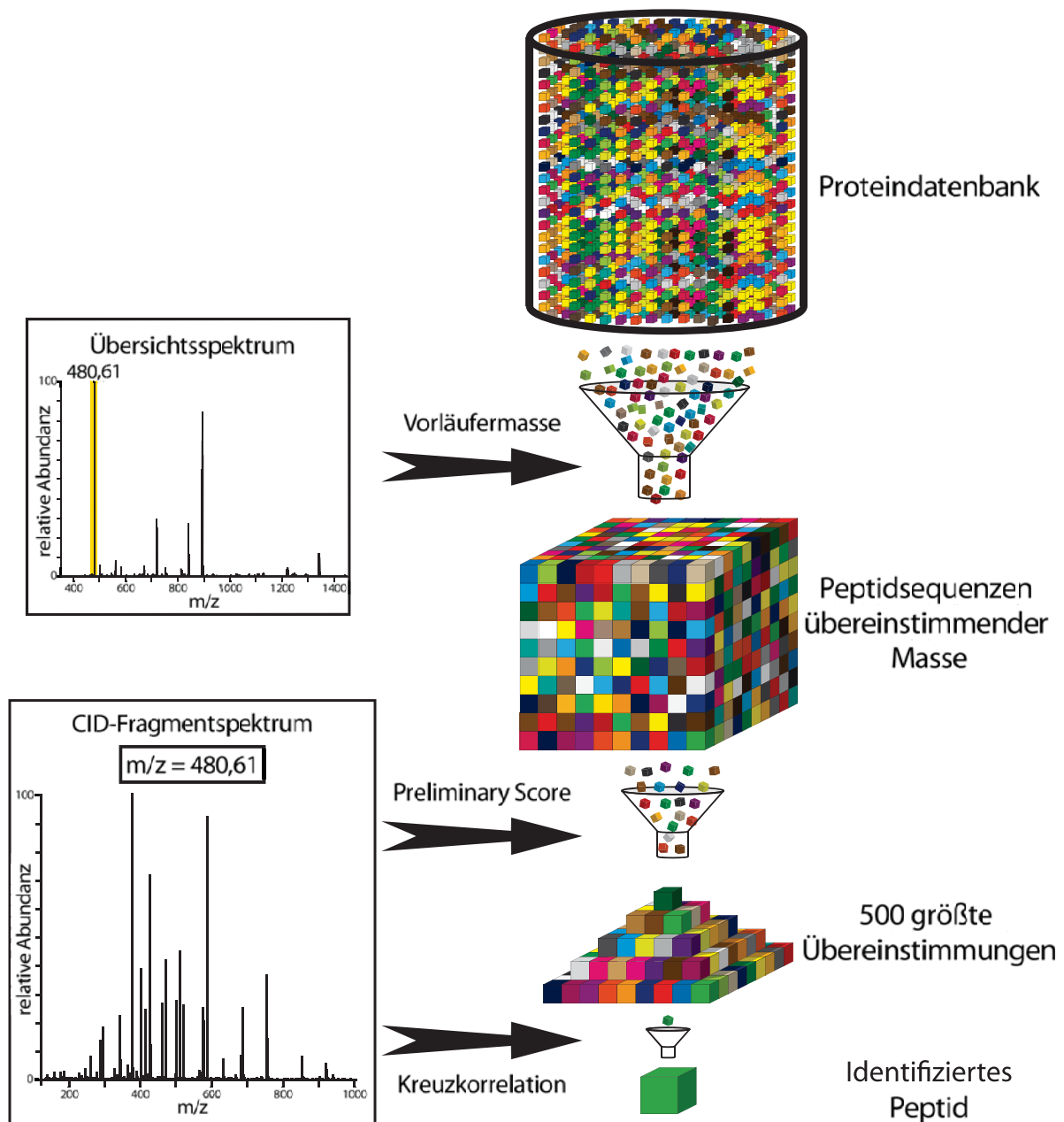


Abb. 6: Prinzip des SEQUEST-Algorithmus. Zunächst werden aus der Proteindatenbank jene Proteine bestimmt, die zur Vorläufermasse isobare Peptidsequenzen aufweisen. Von diesen Peptidsequenzen werden theoretische MS/MS-Spektren generiert. Über einen *Preliminary Score* werden die 500 Peptidsequenzen mit der größten Ähnlichkeit zum experimentellen MS/MS-Spektrum vorausgewählt. Für diese 500 Peptidsequenzen wird anschließend jeweils eine normierte Kreuzkorrelation zwischen den theoretischen und dem experimentellen MS/MS-Spektren durchgeführt, wodurch sich die Peptidsequenz mit der höchsten Übereinstimmung bestimmen lässt.

Zunächst wird die Vorläufermasse des Peptids mit der Proteindatenbank abgeglichen. Es werden nur solche Proteine berücksichtigt, die mit der Vorläufermasse isobare Sequenzen enthalten. Durch Einschränken der Proteindatenbank auf bestimmte Parameter, wie beispielsweise einem bestimmten Organismus, kann die Zahl der berücksichtigten Proteine

weiter eingeeengt werden. Bei Verwendung von Trypsin macht es darüber hinaus Sinn, nur Proteine mit tryptischen Peptidsequenzen zu berücksichtigen. Von den auf diese Weise erhaltenen Peptidsequenzen werden anschließend theoretische MS/MS-Spektren generiert. Um Zeit- und Rechenaufwand zu sparen, wird nun zunächst ein *Preliminary Score* gebildet, in dem die Intensitäten der Signale summiert werden, die zwischen dem experimentellen MS/MS-Spektrum und den jeweiligen theoretischen MS/MS-Spektren der Peptidsequenzen übereinstimmen. Nachfolgend ist die ursprüngliche Formel des *Preliminary Score* dargestellt:

$$S_p = \left(\sum_k I_k \right) m(1 + \beta)(1 + \rho) / L \quad (1)$$

Neben der Summe von den Intensitäten (I_k) der übereinstimmenden Signale, enthält die Formel noch weitere Bewertungsfaktoren. Die Variable m beschreibt die Anzahl der übereinstimmenden Signale. Der Nenner L beschreibt die maximale Anzahl von möglichen Fragmentsignalen in den theoretischen Spektren. Dies soll verhindern, dass längere Peptide, die statistisch eine höhere Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung haben, stärker gewichtet werden. β ist ein Zusatzwert dafür, dass in den Fragmentserien aufeinanderfolgende Signale gefunden wurden. ρ ist ein weiterer Wert für das Auftreten von Immoniumionen. Der *Preliminary Score* wird für alle Peptidsequenzen berechnet. Anschließend werden nur noch die 500 Proteine mit dem höchsten Score berücksichtigt. Für diese 500 Proteine erfolgt nun die eigentliche Bewertung, indem die theoretischen MS/MS-Spektren der Peptidsequenzen mit dem experimentellen MS/MS-Spektrum über eine Kreuzkorrelation verglichen werden. Da es bisher jedoch fast unmöglich ist, die Intensitäten der Fragmente eines Peptids vorherzusagen, werden sowohl die theoretischen MS/MS-Spektren als auch das experimentelle MS/MS-Spektrum in ihren Intensitäten normiert. Für jedes theoretische MS/MS-Spektrum (T) wird die Kreuzkorrelation mit dem experimentellen Spektrum (E) durchgeführt:

$$Corr(E, T) = \sum_i^N x_i y_{i+\tau} \quad (2)$$

Mithilfe der Kreuzkorrelation lässt sich die Ähnlichkeit zweier Signale bestimmen, wenn diese um einen Wert τ verschoben sind. Ähneln sich die Signale, so hat die Korrelationsfunktion für ein bestimmtes τ ein Maximum. Ein einfaches Beispiel zur Veranschaulichung sind die

Funktionen $y(x) = \sin(x)$ und $y(x) = \cos(x)$, deren Signale um $\pi/2$ verschoben sind. D. h., Die Korrelationsfunktion hat hier für $\tau = \pi/2$ ihr Maximum. Da sich die theoretischen MS/MS-Spektren nicht vom experimentellen Spektrum unterscheiden sollten, sollten die Korrelationsfunktionen für $\tau = 0$ ihr Maximum haben. Aus diesem Grund wird die Korrelationsfunktion jeweils für $\tau = 0$ bestimmt. Um zu verhindern, dass dadurch falsche positive Ergebnisse erhalten werden, wird von den Werten jeweils der Mittelwert der Korrelationsfunktion für das Intervall $-75 < \tau < 75$ abgezogen. Die Peptidsequenz mit dem höchsten so bestimmten Score ist somit mit hoher Wahrscheinlichkeit die gesuchte Sequenz. Abschließend werden die verschiedenen identifizierten Peptidsequenzen eines Proteins gruppiert und zusammengefasst.

2.7 Quantitative Proteinanalytik

Neben der Identifizierung lässt sich die MS auch zur Quantifizierung von Proteinproben nutzen. Ein MS-basierter Quantifizierungsansatz, der seit einiger Zeit bevorzugt genutzt wird, ist die markierungsfreie Quantifizierung^[92]. Hierbei werden Proteine in unterschiedlichen MS-Messungen relativ zu einander quantifiziert. Die Quantifizierung kann unter anderem über die Signalintensitäten in den extrahierten Ionenchromatogrammen erfolgen. Ein anderer markierungsfreier Quantifizierungsansatz ist das Zählen der MS/MS-Spektren, die sich einem Protein zuordnen lassen. Der Grundgedanke dabei ist, dass die Ionen der Peptide eines abundanten Proteins häufiger fragmentiert werden als die Ionen eines weniger abundanten Proteins. Vorteile der markierungsfreien Quantifizierung sind insbesondere die Zeit- und Kostenersparnis in der Probenvorbereitung, da kein zusätzlicher Arbeitsschritt für die Markierung der Proteine oder Peptide mit einem meist kostspieligen Reagenz notwendig ist. Andererseits ist beim markierungsfreien Ansatz kein Multiplexing, d. h. das simultane Analysieren von mehreren Proben in einer Messung, möglich. Folglich muss jede Probe separat gemessen werden. In diesem Zusammenhang ergibt sich auch der größte Nachteil der markierungsfreien Quantifizierung. Da die Proben erst in der Datenauswertung verglichen werden und vorher völlig separat sind, stellt jeder Arbeitsschritt, von der Probennahme bis zur massenspektrometrischen Analyse, eine potentielle Fehlerquelle dar. Gerade bei der Ionisierung kann es z. B. durch Sprayfluktuationen oder einer unterschiedlichen Ionisierbarkeit infolge von unterschiedlichen Probenzusammensetzungen zu sehr großen Schwankungen kommen. Aus diesen Gründen haben markierungsfreie Ansätze eine deutlich

geringere Genauigkeit als Quantifizierungsansätze, die auf einer Markierung basieren. Daher müssen für verlässliche Quantifizierungsergebnisse in der Regel relativ große Probensätze analysiert werden, die dann computergestützt über *Big Data* Verfahren ausgewertet werden^[93]. In Abbildung 7 ist der typische Arbeitsablauf für diverse Quantifizierungsstrategien mit dem jeweiligen Zeitpunkt der Vereinigung der verschiedenen Proben dargestellt.

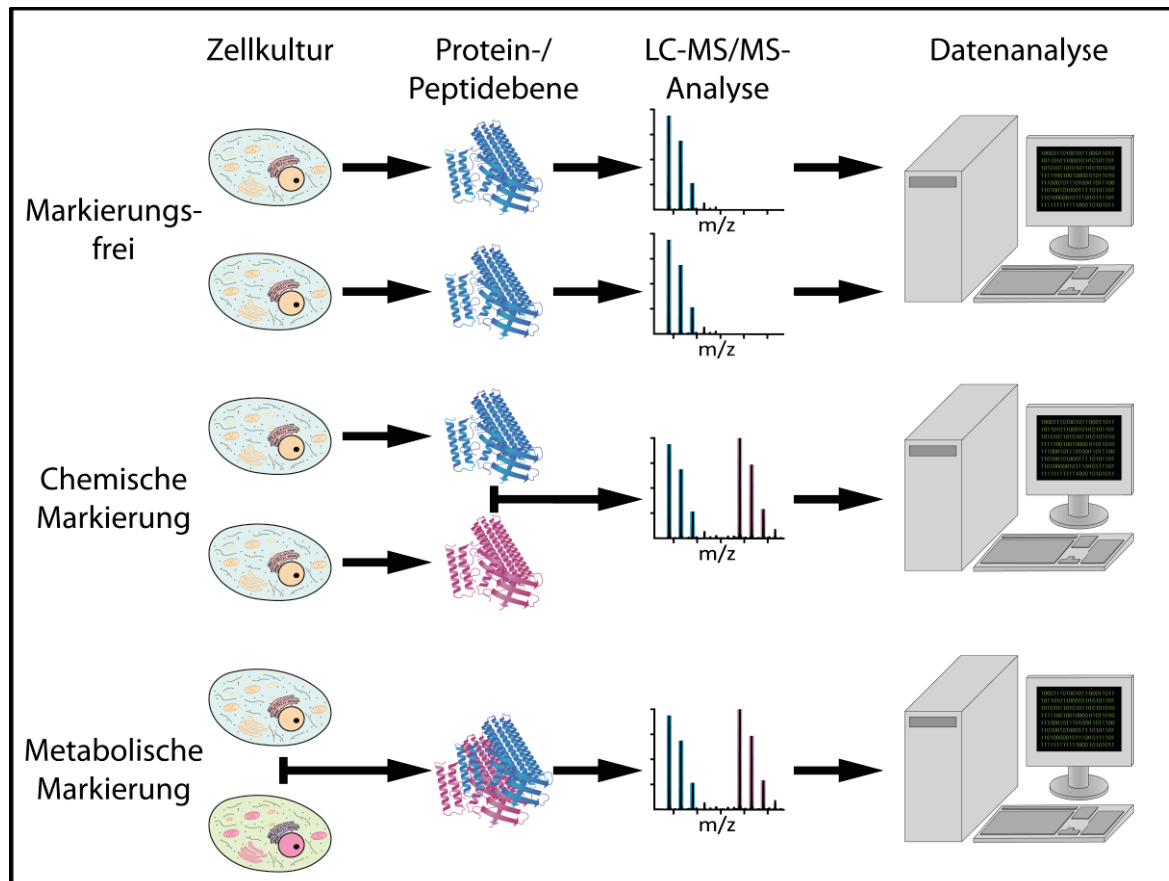


Abb. 7: Typische Arbeitsabläufe für MS-basierte Quantifizierungsstrategien. Bei markierungsfreien Ansätzen gibt es keine Probenvereinigung, der Vergleich erfolgt erst bei der Datenanalyse. Bei chemischen Markierungsstrategien erfolgt die Vereinigung auf Protein- oder Peptidebene, die Proben werden zusammen aufgetrennt und analysiert. Beim metabolischen Markieren kann die Vereinigung bereits auf Zellebene passieren (Abbildung modifiziert nach ^[92]).

Bei den Quantifizierungsansätzen, die auf einer Markierung basieren, kann die relative Quantifizierung in einer Messung erfolgen. Dies wird ermöglicht, indem mithilfe der Markierung ein Massenunterschied (engl. *mass shift*) in den Proteinen der unterschiedlichen Proben generiert wird. Dadurch ergeben sich für die Proteine bzw. Peptide der unterschiedlichen Proben jeweils unterschiedliche Signale im Massenspektrum. Über diese Signale kann anschließend die Quantifizierung erfolgen. Die Herausforderung hierbei ist, dass

sich die zur Generierung des Massenunterschieds differenziell markierten Proteine und Peptide in ihren physikochemischen Eigenschaften, wie dem Trenn- oder Ionisierungsverhalten, möglichst nicht unterscheiden sollten. Aus diesem Grund wird der Massenunterschied vorrangig mithilfe von Isotopenmarkierungen generiert.

Innerhalb der auf Isotopenmarkierung basierenden Quantifizierungsansätze wurden diverse Methoden für das Einbringen der Isotopen in den Analyten entwickelt. Ein Ansatz ist das metabolische Markieren. Bei SILAC (engl. *stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) werden die Isotopen bereits bei der Kultivierung der Probe eingeführt^[94]. Dies wird erreicht, indem Zellkulturen mithilfe von Nährmedien mit isotopenangereicherten Aminosäuren kultiviert werden. Als Referenz werden Zellen kultiviert, denen Aminosäuren mit natürlicher Isotopenzusammensetzung zugesetzt werden. Durch Kombination von passenden isotopenangereicherten Aminosäuren und Proteasen lassen sich so Peptide mit einem definierten Massenunterschied generieren, welcher zur Quantifizierung genutzt werden kann. Beispielsweise führt die Kombination von [$^{13}\text{C}_6$]-Lysin mit der Protease Lys-C zu Peptiden mit einem Massenunterschied von jeweils 6 Da. Vorteile von SILAC sind einerseits die frühzeitige Kombination der Proben, welche direkt im Anschluss an die Gewinnung der Zellen erfolgen kann. Andererseits ist kein zusätzlicher Markierungsschritt in der Probenvorbereitung notwendig. Beide Punkte führen zu einer deutlich geringeren Fehleranfälligkeit infolge der Probenvorbereitung^[95]. Problematisch sind insbesondere der hohe Zeit- und Kostenaufwand zur Kultivierung isotopenangereicherter Zellen. Darüber hinaus ist die Methode fast ausschließlich für Zellkulturen nutzbar und besitzt folglich eine sehr begrenzte Anwendbarkeit. Es gab zwar in den letzten Jahren auch erste Anwendungen auf höhere Organismen, wie z. B. SILAC-Pflanze^[96], SILAC-Fliege^[97] oder auch SILAC-Maus^[98], allerdings ist dies sogar mit einem noch größeren Kosten- und Zeitaufwand verbunden.

Neben der metabolischen Markierung lassen sich die Isotopen auch auf chemischem Wege in Proteine einführen, indem ein isotopenangereichertes Markierungsreagenz verwendet wird. Gängige chemische Markierungsstrategien sind beispielsweise ICAT (engl. *isotope-coded affinity tag*)^[99] und iTRAQ (engl. *isobaric tags for absolute and relative quantification*)^[100]. Bei ICAT, welches das erste kommerziell erhältliche Isotopenmarkierungsreagenz für die relative massenspektrometrische Quantifizierung war, wird das Reagenz, welches sowohl die Isotopen als auch eine Biotingruppe enthält, über eine Iodacetamid- oder eine

Acrylamidfunktionalität kovalent an Cysteinreste gebunden. Eine Besonderheit bei iTRAQ, welches an Aminfunktionen im Protein bindet, ist, dass die verschiedenen isotopenangereicherten Reagenzien isobar zueinander sind. Erst infolge der Fragmentierung im MS/MS-Experiment wird eine Massendifferenz generiert, welche für die Quantifizierung genutzt werden kann.

Eine weitere chemische Isotopenmarkierungsstrategie ist ICPL (engl. *isotope-coded protein label*)^[101]. Das ICPL-Reagenz basiert auf Nikotinsäure-N-hydroxysuccinimid (NHS)-estern, welche ebenfalls an die Aminfunktionen im Protein binden. Zur Generierung des Massenunterschieds werden die Kohlenstoff- oder Wasserstoffatome der Nikotinsäure durch ¹³C bzw. Deuterium ersetzt. Je nachdem, ob nur die Kohlenstoffatome, nur die Wasserstoffatome oder beide isotopenangereicht sind, ergeben sich vier verschiedene Massen für das Markierungsreagenz. Dementsprechend kann die Methode für Quadruplexquantifizierungen genutzt werden. Gegenüber der sehr ähnlichen ICAT-Strategie konnten diverse Vorteile beobachtet werden^[95]. Trotz der ICPL-Markierung bleiben viele physikochemische Eigenschaften der Proteine erhalten. Darüber hinaus verbessert die Nikotinsäuremarkierung die Ionisierbarkeit der Peptide.

Neben der Isotopenmarkierung kann die Massendifferenz für die Quantifizierung auch durch Verwendung unterschiedlicher Elemente in den Markierungsreagenzien generiert werden. Damit ist jedoch das Risiko verbunden, dass sich die physikochemischen Eigenschaften der differenziell markierten Proteine unterscheiden. Aus diesem Grund werden für die Markierung mit unterschiedlichen Elementen häufig Chelatkomplexe verwendet. Eine Quantifizierungsstrategie, die darauf basiert ist MeCAT (engl. *metal-coded affinity tag*). MeCAT wurde 2007 durch die Arbeitsgruppe um LINSCHIED vorgestellt^[102]. Beim MeCAT-Reagenz handelt sich um einen bifunktionellen Chelatkomplex, welcher kovalent an Proteine und Peptide bindet. Als Chelatligand wurde aufgrund der hohen Komplexstabilität DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) gewählt. Je nach gewählter Funktionalität kann das MeCAT-Reagenz an diverse funktionelle Gruppen des Proteins binden^[102-104], wobei sich insbesondere das Markieren der Thiofunktionen in Cysteinresten durchgesetzt hat. Das ursprüngliche MeCAT-Reagenz hatte zur Bindung an den Cysteinresten eine Maleinimidfunktionalität (MeCAT-Mal, Vgl. Abb. 8). Jedoch kam es infolge der Markierung zur Bildung von Diastereomeren, welche durch HPLC getrennt werden können.

Aus diesem Grund wurde im Jahr 2011 von SCHWARZ *et al.* ein MeCAT-Reagenz mit Iodacetamidfunktionalität (MeCAT-IA, Vgl. Abb. 8) vorgestellt^[105], bei dem die Bindung an die Thiofunktion nicht mehr zur Bildung eines chiralen Zentrums und damit zur Bildung von Diastereomeren führt.

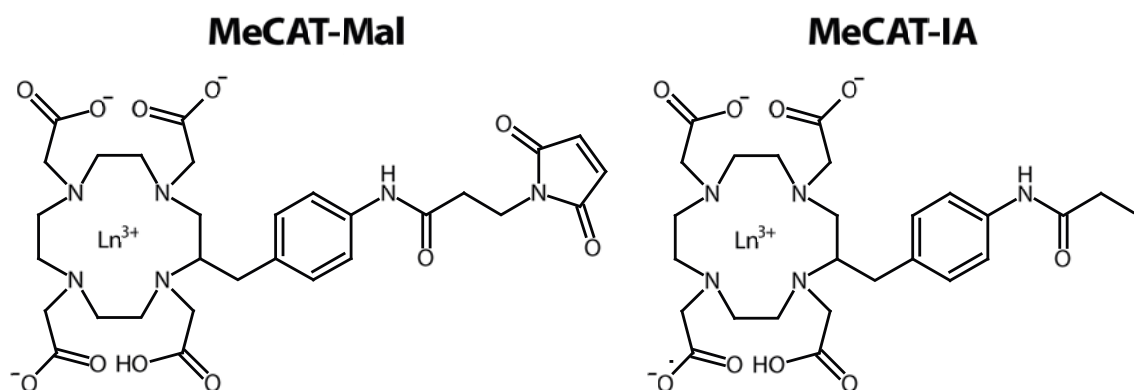


Abb. 8: Strukturformeln der MeCAT-Reagenzien mit Maleinimidfunktionalität (links) und mit Iodacetamidfunktionalität (rechts). Die Additionsreaktion an die Doppelbindung des Maleinimids während der Markierung führt zur Bildung von Diastereomeren (Abb. nach ^[102, 105]).

Als komplexiertes Metall werden bei MeCAT bevorzugt Lanthanoide eingesetzt. Diese bilden mit DOTA einen sehr stabilen Komplex, was eine Dissoziation oder einen Metallaustausch sehr unwahrscheinlich macht^[106]. Darüber hinaus unterscheiden sich die verschiedenen DOTA-Lanthanoidkomplexe eher geringfügig in ihren physikochemischen Eigenschaften. So koeluieren die mit verschiedenen Metallen markierten Proteine und Peptide weiterhin bei chromatografischen Trennungen. Dass viele der Lanthanoide monoisotopisch sind, ist ebenfalls für die Quantifizierung von Vorteil. Ein weiterer Vorteil von Elementmarkierungen und im Speziellen von Lanthanoidmarkierungen ist, dass diese auch mittels ICP-MS quantifiziert werden können. Die Vorteile der Lanthanoide sind hier unter anderem die geringe biologische Abundanz der Lanthanoide und, infolge der großen Masse, nur geringe Interferenzen im ICP-MS. Da bei ICP-MS die Elementsignale direkt gemessen werden, ist hier mit MeCAT auch mit wenig Aufwand eine absolute Quantifizierung umsetzbar, wobei die externe Kalibrierung mithilfe von Salzstandards erfolgen kann^[107]. Darüber hinaus ist MeCAT auch mit der LA-ICP-MS kombinierbar. MeCAT-markierte Proteine, die mittels SDS-PAGE getrennt wurden, können mittels LA-ICP-MS direkt im getrockneten Polyacrylamidgel analysiert werden^[81]. So konnten beispielsweise die Proteine eines humanen Zelllysats mittels LA-ICP-MS orts aufgelöst in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen quantifiziert werden^[108].

Gerade diese Möglichkeiten machen Die MeCAT-Strategie interessant für eine Quantifizierung von komplexen biologischen Proteinproben.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Lyse

In dieser Arbeit sollten erstmals Proteine von verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* zueinander quantifiziert werden. Für eine erfolgreiche Quantifizierung müssen die Proteine jedoch erst einmal mit möglichst hoher Ausbeute aus den Zellen extrahiert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Zelllyse optimiert. Die umfangreichen Optimierungsexperimente wurden aus Kosten- und Verfügbarkeitsgründen an *E. coli* K-12 Zellen durchgeführt. Da sowohl *E. coli* als *B. bacteriovorus* gram-negative Bakterien sind, sind ihre Membranen prinzipiell ähnlich aufgebaut, wodurch sich die Ergebnisse der Optimierung auch auf *B. bacteriovorus* übertragen lassen sollten. Darüber hinaus befinden sich die Zellen von zwingend-prädatorischen *B. bacteriovorus* während der Wachstumsphase innerhalb der Wirtsmembran. Folglich muss für eine erfolgreiche Extraktion der Proteine von *B. bacteriovorus* während der Wachstumsphase auch die Membran von *E. coli* als Wirt zersetzt werden. Als Referenzmethode für die Lyse wurde die *Freeze-Thaw-Lysozyme* Lyse gewählt^[109]. Bei dieser Methode werden die Zellen mehrfach zügig eingefroren und wieder aufgetaut. Dies führt infolge der schnellen Volumenänderungen des gefrierenden und tauenden Wassers innerhalb der Zelle zum Zerreißen der Zellmembran. Das Lysozym wirkt zusätzlich bei der Zersetzung der Peptidoglycanschicht mit. Die Optimierung wurde auf Grundlage der Empfehlungen des EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) durchgeführt^[110].

pH-Wert der Lyse

Zunächst wurde der optimale pH-Wert für die Lyse bestimmt. Dafür wurde die Lyse im pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 durchgeführt, wobei der pH-Wert jeweils in 0,5er Schritten erhöht wurde. Um diesen großen pH-Bereich abzudecken, wurden Puffer aus Natriumacetat, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) oder Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) hergestellt. Weiterhin wurden den Puffern jeweils Lysozym für die Zersetzung der Peptidoglycanschicht, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für die Inhibierung von Metalloproteasen und zur Unterstützung der Peptidoglykanlyse^[111], und Natriumchlorid zur Aufrechterhaltung der Ionenstärke zugesetzt. Die Qualität der Lyse wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (Abb. 9).

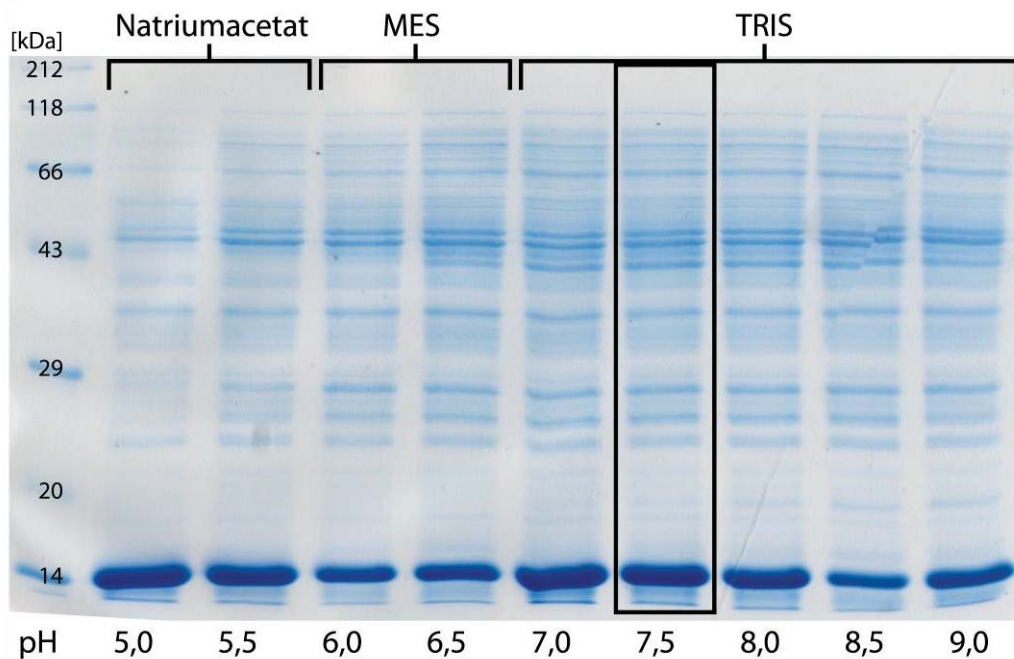


Abb. 9: Polyacrylamidgel der Lyseoptimierungsansätze mit verschiedenen pH-Werten. Für die pH-Werte 5,0 und 5,5 wurde Natriumacetat, für 6,0 und 6,5 wurde MES und für die restlichen pH-Werte wurde TRIS als Pufferion verwendet. Die markierte Bande bei pH 7,5 entspricht dem Parameter, der für die weitere Optimierung verwendet wurde.

Die Lyse lieferte prinzipiell im basischen pH-Bereich bessere Ergebnisse als im sauren pH-Bereich. Insbesondere bei pH-Werten unterhalb 6,5 nahm die Proteinausbeute deutlich ab. Bei pH-Werten oberhalb von 8,0 gab es geringfügige Verluste bei Proteinen mit kleiner Masse. Der optimale pH-Bereich lag bei 7,0 bis 8,0, da hier einerseits die höchsten Proteinausbeuten vorlagen und andererseits der pH-Bereich nahe an physiologischen Bedingungen war. Aus diesem Grund wurde die weitere Optimierung bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt.

Pufferion der Lyse

Als nächster Schritt wurde für den optimalen pH-Wert bestimmt, welches Pufferion die besten Lyseergebnisse liefert. Die *Freeze-Thaw-Lysozyme* Lyse wurde unter Zugabe der gleichen Additive wie zuvor bei einem pH-Wert von 7,5 mit einem TRIS-Puffer, einem Phosphatpuffer, einem Imidazolpuffer, einem *N*-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin)-puffer und einem 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer durchgeführt. Das dazugehörige Polyacrylamidgel ist in Abbildung 10 zu sehen.

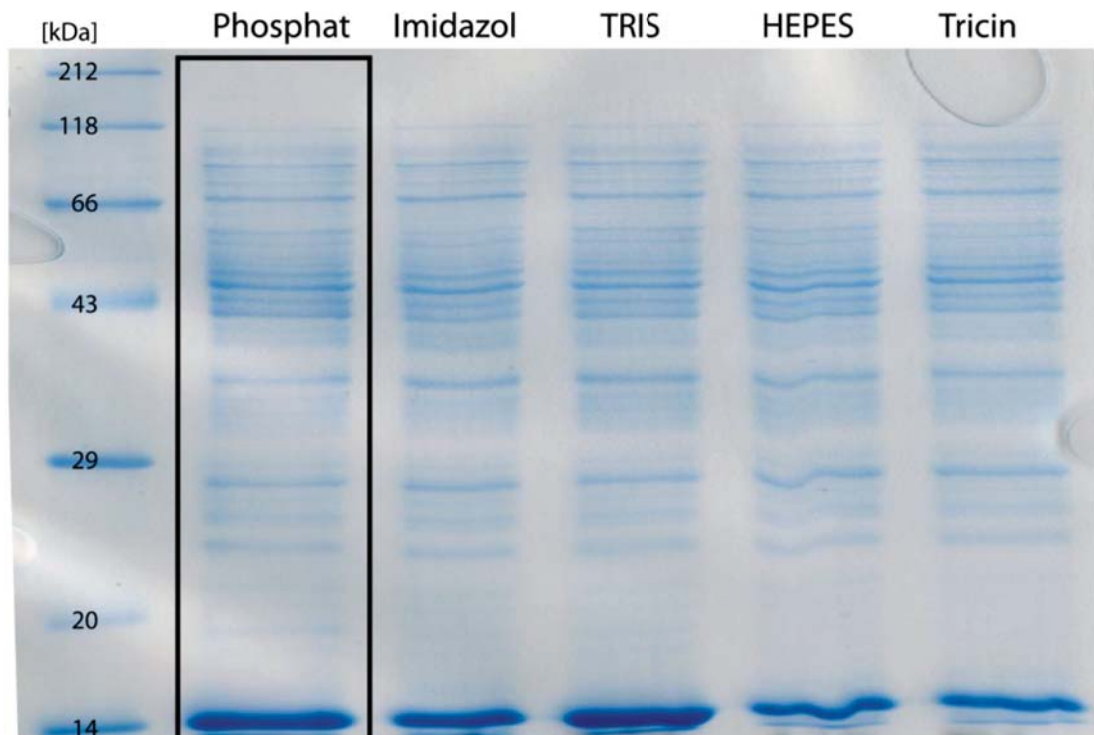


Abb. 10: Polyacrylamidgel der Lyseoptimierungsansätze mit verschiedenen Pufferionen. Die Lyse wurde jeweils mit den gleichen Additiven wie zuvor bei einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt. Die markierte Bande bei Phosphat entspricht dem Parameter, der für die weitere Optimierung gewählt wurde.

Alle Puffer lieferten akzeptable Ergebnisse. Bei HEPES und Tricin gab es jedoch Verluste bei den Proteinen mit kleiner Masse (20 kDa-Bereich). Die anderen drei Puffer generierten sehr ähnliche Proteinausbeuten. Bei Imidazol traten geringfügige Verluste bei Proteinen im Bereich von 100 kDa auf, während bei TRIS im niedrigen Massenbereich sehr leichte Verluste beobachtet werden konnten. Deshalb wurde Phosphat als Pufferion für die weitere Optimierung gewählt.

Lysemethode

Im letzten Optimierungsschritt sollte die Lysemethode optimiert werden. Neben der eigentlichen Lysemethode wurde auch untersucht, ob Detergenzien einen positiven Einfluss auf die Lyse haben. Es wurden Experimente mit den Detergenzien Triton X-100 und SDS durchgeführt. Darüber hinaus wurde ebenfalls untersucht, ob die Lyse auch ohne Lysozym erfolgreich durchgeführt werden kann, da dieses aufgrund der hohen Konzentration störend bei der späteren Proteinidentifizierung und -quantifizierung sein könnte. In Tabelle 1 sind die getesteten Lysebedingungen aufgelistet.

Tab. 1: Auflistung der getesteten Lysebedingungen. Sämtliche Ansätze wurden bei einem pH-Wert von 7,5 in Phosphatpuffer und mit den Additiven Natriumchlorid und EDTA durchgeführt.

Ansatz	Lysebedingungen	Detergenzzugabe	Lysozymzugabe
1	<i>Freeze-Thaw</i>	Nein	Ja
2	<i>Freeze-Thaw</i>	Nein	Nein
3	1 h bei 100°C erhitzen	Nein	Nein
4	Ultraschallbad	Nein	Nein
5	1 h bei 20°C schütteln	Triton X-100	Ja
6	<i>Freeze-Thaw</i>	Triton X-100	Nein
7	Ultraschallbad	Triton X-100	Nein
8	<i>Freeze-Thaw</i>	SDS	Nein
9	Ultraschallbad	SDS	Nein

Alle Ansätze wurden mit dem Phosphatpuffer auf pH 7,5 gepuffert und ihnen wurde Natriumchlorid und EDTA zugesetzt. Neben der *Freeze-Thaw* Lyse wurde auch eine rein chemische Lyse durch einstündiges Schütteln der Zellen bei Raumtemperatur mit den Additiven untersucht (Ansatz 5). Weiterhin wurde zur Unterstützung der Lyse teilweise ein Ultraschallbad eingesetzt (Ansätze 4, 7 und 9). In einem weiteren Ansatz (Ansatz 3) wurde untersucht, ob für eine erfolgreiche Lyse auch schon ein einstündiges Erhitzen der Zellen ausreicht. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Experimente in Form des dazugehörigen Polyacrylamidgels dargestellt.

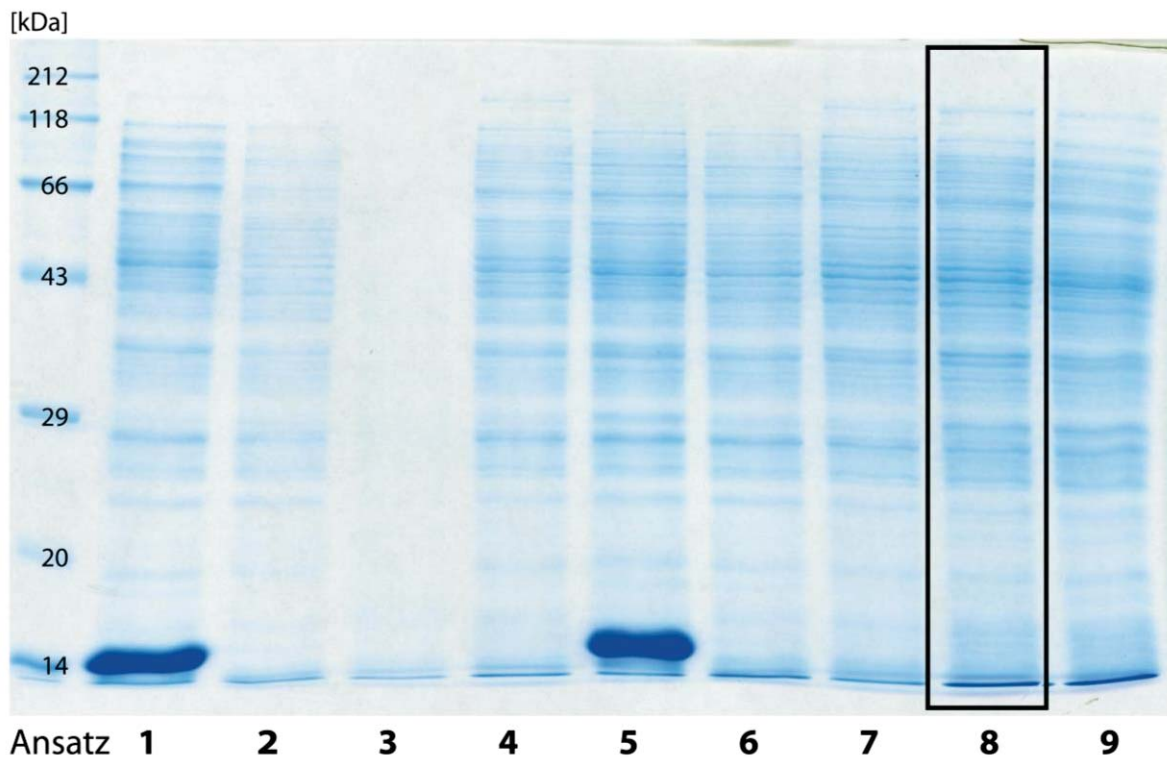


Abb. 11: Polyacrylamidgel der Lyseoptimierung bezüglich verschiedener Additive und Lysebedingungen. Die Ansatzbezeichnungen entsprechen den Ansatzbezeichnungen aus Tab. 1. Die markierte Bande bei Ansatz 8 (*Freeze-Thaw* Lyse mit SDS) entspricht dem gewählten optimierten Parameter.

Es zeigte sich, dass sich die Zellen allein durch Erhitzen nicht lysieren ließen. Auch eine reine *Freeze-Thaw* Lyse ohne Lysozym führte zu deutlich verringerten Proteinausbeuten. Die Zugabe von Detergenzien führte dagegen prinzipiell zu erhöhten Proteinausbeuten. Dies ist nachvollziehbar, da die Detergenzien sowohl an der Lyse der Zellmembran mitwirken als auch die Löslichkeit der extrahierten Proteine erhöhen. Auch durch die rein chemische Lyse mithilfe von Detergenz und Lysozym ließen sich hohe Proteinausbeuten generieren. Durch die Kombination von Detergenzien mit der *Freeze-Thaw* Lyse bzw. dem Ultraschallbad ließen sich die hohen Proteinausbeuten allerdings auch ohne Lysozym erzielen. Die Proteinausbeuten waren, sowohl bezüglich der Zahl der Banden als auch bezüglich ihrer Abundanz, bei Verwendung von SDS höher als bei Triton X-100. Bei Verwendung von SDS lieferten sowohl die *Freeze-Thaw* Lyse als auch das Ultraschallbad vergleichbar gute Ergebnisse, wobei die Zahl der Proteinbanden bei der *Freeze-Thaw* Lyse minimal größer war als beim Ultraschallbad. Aus diesem Grund und auch, weil die *Freeze-Thaw* Lyse eine höhere Reproduzierbarkeit als das verwendete Ultraschallbad aufwies, wurden als optimierte

Lyseparameter für *E. coli* die *Freeze-Thaw* Lyse im Phosphatpuffer bei pH 7,5 mit den Additiven Natriumchlorid, EDTA und SDS, jedoch ohne Lysozym, gewählt.

3.2 Optimierung der MeCAT-Markierungsreaktion

Neben der Optimierung der Lyse wurde versucht, die MeCAT-Markierungsreaktion für die komplexen Proben zu modifizieren und zu optimieren. Die ursprünglichen Markierungsbedingungen für MeCAT-IA waren ein 75 mM Boratpuffer bei pH 8,2 mit 6 M Harnstoff und 20 % (v/v) Aceton zur Entfaltung der Proteine. Für die Markierung wurden die reduzierten Proteine in dieser Mischung zusammen mit dem MeCAT-Reagenz für 2 h bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert^[105]. Jedoch haben diese Reaktionsbedingungen auch einige Nachteile. Der Boratpuffer hat den Nachteil, dass Borat nur begrenzt wasserlöslich ist^[112], wodurch die Konzentration des Puffers und damit auch die Pufferkapazität begrenzt sind. Harnstoff hat bei den hohen Konzentrationen ein sehr großes Eigenvolumen, was zu Volumenverfälschungen und daher eventuell zu Verfälschungen bei der Quantifizierung führen kann. Das Aceton hat infolge seines hohen Dampfdrucks sogar einen noch größeren Einfluss auf eventuelle Volumenverfälschungen, da es während der Arbeit mit der Probe kontinuierlich verdampft und damit die Probe aufkonzentriert. Daher wurde versucht, diese potentiellen Probleme der Markierungsreaktion zu beheben.

Puffer der Markierungsreaktion

Zunächst wurde untersucht, ob die Markierungsreaktion auch mit anderen Puffern als Borat quantitativ abläuft. Als Modellprotein für Optimierungsexperimente wurde α -Lactalbumin gewählt. Dieses hat mit 8 Cysteinresten und einer Masse von etwa 14 kDa sehr günstige Eigenschaften für die Markierungsuntersuchungen. Für die Untersuchungen wurden die gleichen Pufferionen wie bei den Lyseoptimierungsexperimenten gewählt, d. h. neben Borat auch Phosphat, TRIS und HEPES. Als Metall für das MeCAT-Reagenz wurde jeweils Holmium gewählt. Die restlichen Reaktionsparameter wurden nicht verändert. In Abbildung 12 ist das dazugehörige Polyacrylamidgel zu sehen.

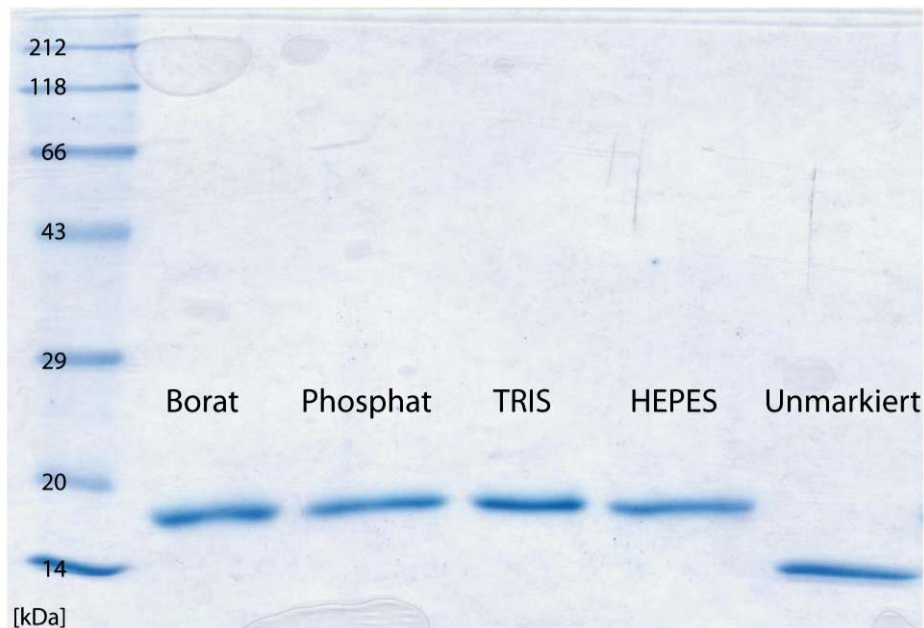


Abb. 12: Polyacrylamidgel von α -Lactalbumin für die Untersuchungen bezüglich anderer Pufferionen für die MeCAT-Markierungsreaktion. Als Referenz wurde jeweils die klassische MeCAT-Reaktion in Borat nach ^[105] und unmarkiertes α -Lactalbumin auf das Gel aufgetragen.

Es konnte kein negativer Einfluss der Puffer auf die Markierungsreaktion festgestellt werden. Unabhängig vom gewählten Puffer migrierten die Proteine gleich weit auf dem Gel wie das Referenzsystem in Borat, was auf eine vollständige Markierung schließen lässt. Um sicher zu stellen, dass die Markierungsreaktion in den anderen Puffern wirklich quantitativ ablief, wurden die Proben nach der Markierung jeweils mittels HPLC-ESI-FTICR-MS analysiert. In Abbildung 13 sind die Ladungsserien der unmarkierten Referenz und beispielhaft der in TRIS-Puffer durchgeführten Reaktion dargestellt. Basierend auf den Ladungsserien wurde für jedes Puffersystem die Masse des α -Lactalbumins berechnet (Tab. 2). Es konnte in keinem Puffersystem unmarkiertes α -Lactalbumin (theoretische Masse 14.185 Da) detektiert werden. Die berechneten Massen stimmten gut mit der theoretischen Masse (19.874 Da) des achtfach mit Ho-MeCAT markierten α -Lactalbumins überein.

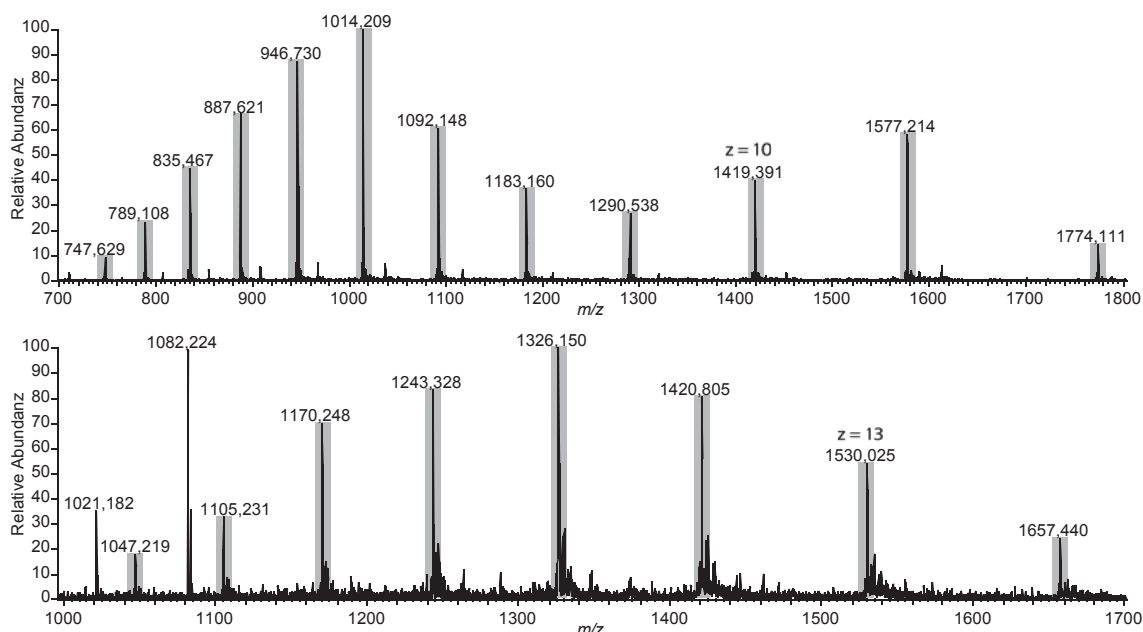


Abb. 13: ESI-FTICR-MS-Spektren des unmarkierten Referenzansatzes (oben) und des Markierungsansatzes in TRIS-Puffer (unten). Es wurde jeweils das Durchschnittsspektrum für einen Retentionsbereich von 15,8 min bis 18,5 min gebildet. Die Ladungsseries von α -Lactalbumin sind grau unterlegt.

Folglich hat das Puffersystem zumindest bei den untersuchten Puffern keinen Einfluss auf die Markierungsreaktion, wodurch künftig auch andere Puffer für die Markierungsreaktion gewählt werden können. Gerade für komplexe Proben wäre es in diesem Zusammenhang ideal, wenn als Markierungspuffer der jeweilige Lysepuffer verwendet werden könnte, wodurch keine Umpufferung notwendig wäre. Aus diesem Grund wurden im nächsten Optimierungsschritt auch verschiedene pH-Werte für die Markierungsreaktion untersucht.

Tab. 2: Aus den Ladungsseries berechnete Massen von α -Lactalbumin für die verschiedenen Puffersysteme und für den Referenzansatz ohne Markierung. Für jedes Puffersystem lag α -Lactalbumin in vollständig markierter Form vor.

Puffer	Borat	Phosphat	TRIS	HEPES	Unmarkiert
Berechnete Masse [Da]	19.877 ± 1	19.877 ± 1	19.877 ± 1	19.877 ± 1	14.185 ± 1
Anzahl Markierungen	8	8	8	8	keine

pH-Wert der Markierungsreaktion

Bei der Markierungsreaktion mit MeCAT-IA handelt es sich um eine basenaktivierte nukleophile Substitution^[113]. Daher ist eine vollständige Reaktion im Sauren eher

unwahrscheinlich. Trotzdem wurden auch pH-Wertuntersuchungen im leicht Sauren durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde aufgrund des großen pufferbaren pH-Bereichs ein Phosphatpuffer gewählt. Die Markierungsreaktion wurde im pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 mit Inkrementen von 0,5 untersucht. Alle anderen Parameter wurden wie zuvor belassen. In Abbildung 14 ist das dazugehörige Polyacrylamidgel zu sehen.

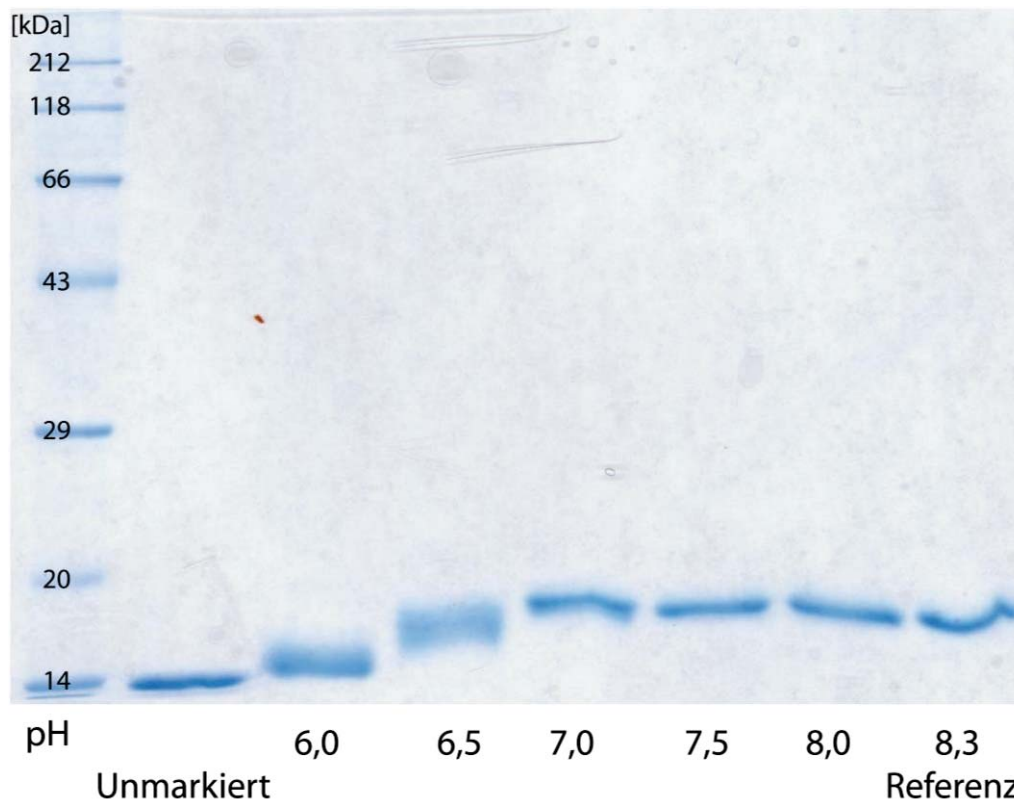


Abb. 14: Polyacrylamidgel von α -Lactalbumin für die Untersuchungen bezüglich des pH-Wertes der Markierungsreaktion. Zum Vergleich wurde links unmarkiertes α -Lactalbumin und rechts in Boratpuffer umgesetztes 8-fach markiertes α -Lactalbumin aufgetragen. Ab pH 7,5 ist die Markierung quantitativ.

Es bestätigte sich, dass die Markierungsreaktion im Sauren nicht quantitativ abläuft. Allerdings konnte eine quantitative Markierung bereits im schwach basischen bei pH-Werten um 7,5 generiert werden. Daher wurde für die weiteren Experimente mit Markierungspuffern bei pH 8,0; dem gleichen pH-Wert wie der optimierte Lysepuffer, gearbeitet.

Einfluss von Detergenzien auf die Markierungsreaktion

Weitere Additive, welche häufig in Lysepuffern verwendet werden, sind Detergenzien. Daher wurde auch die Toleranz der MeCAT-Markierungsreaktion gegenüber Detergenzien untersucht. Es wurde weiterhin mit einem Phosphatpuffer und den Additiven Harnstoff und

Aceton gearbeitet. Die Detergenzien Triton X-100 und SDS wurden in verschiedenen Überschüssen zu der Reaktionsmischung gegeben. In Abbildung 15 ist das daraus resultierende Polyacrylamidgel zu sehen.

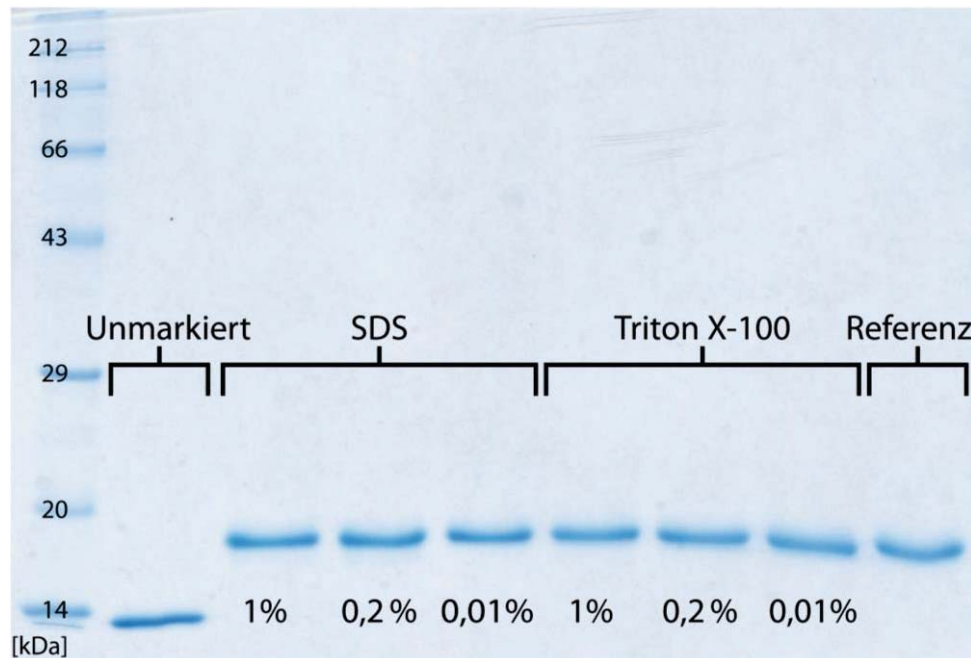


Abb. 15: Polyacrylamidgel von α -Lactalbumin für die Untersuchungen bezüglich der Toleranz der Markierungsreaktion gegenüber Detergenzien. Die Detergenzienmengen beziehen sich auf % (w/v). Die Referenz entspricht den Referenzbedingungen, die in Abb. 14 verwendet wurden.

Es konnte kein negativer Einfluss der Detergenzien auf die Markierung festgestellt werden. Selbst bei Zugabe von 1 % (w/v) SDS, welches eine höhere Konzentration ist als jene, die bei der SDS-PAGE verwendet wird^[114], konnte kein Migrationsunterschied zum Referenzansatz oder auch nur ein Verlaufen der Bande beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Detergenzien die Markierungsreaktion sogar fördern, indem sie bei der Proteinentfaltung mithelfen und damit die Zugänglichkeit zu den Cysteinresten im Protein erhöhen.

Verbesserung der Markierungsreaktion

Basierend auf den bisherigen Beobachtungen bezüglich der Markierungsreaktion wurde versucht, Alternativen zu den hohen Harnstoffkonzentrationen und der Acetonzugabe zu finden. Da für die Detergenzien ein positiver Einfluss auf die Markierungsreaktion vermutet wurde, wurden Experimente mit Detergenzien als ausschließliche Additive für die Reaktion durchgeführt. Darüber hinaus wurden, um das Abdampfen des Acetons zu vermeiden, auch

Ansätze mit längerkettigen Ketonen durchgeführt. Es wurden die Ketone 2-Butanon und 3-Pentanon gewählt, da diese einen zu Wasser vergleichbaren Dampfdruck aufweisen^[115, 116]. Die Ergebnisse des ersten Experiments, bei dem jeweils nur ein Additiv zu den Markierungsreaktionen gegeben wurde, sind in Abbildung 16 dargestellt.

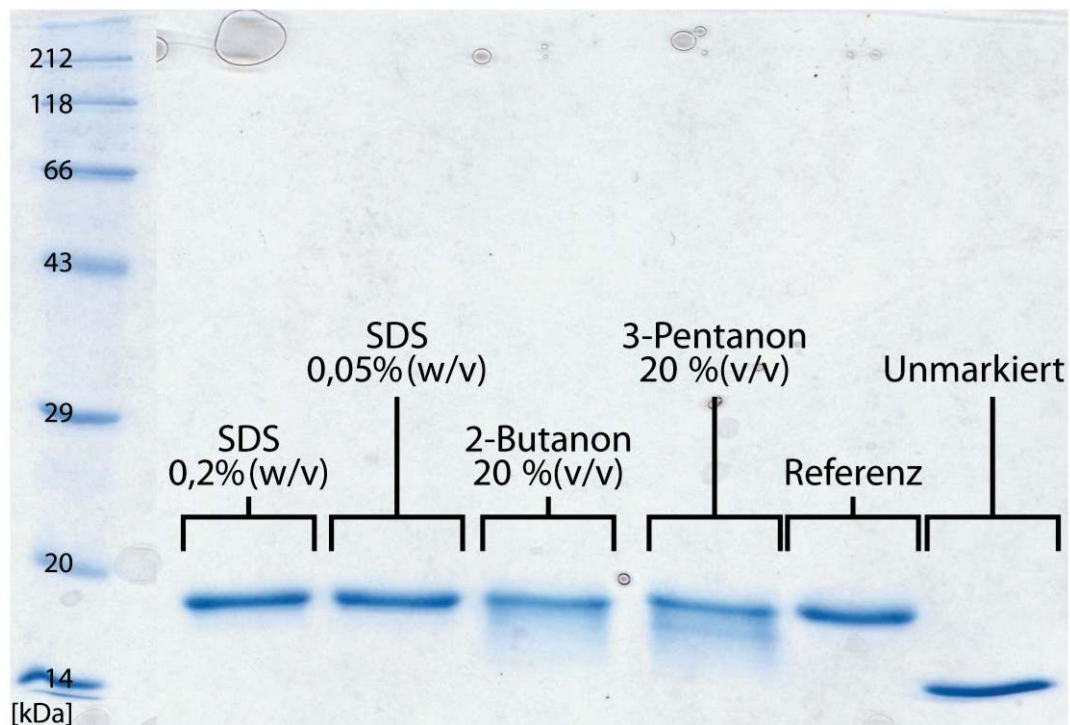


Abb. 16: Polyacrylamidgel von α -Lactalbumin zur Optimierung der Markierungsreaktion. Für die Markierung wurde jeweils nur ein Additiv zugesetzt. Die Referenz entspricht den Referenzbedingungen, die in Abb. 14 verwendet wurden.

Die längerkettigen Ketone führten nur zu einer unvollständigen Markierung, was sich im Verlaufen der Proteinbanden hin zu kleineren Massen ausdrückte. Bei SDS als Additiv konnte eine fast vollständige Markierung erreicht werden. Jedoch konnte auch bei diesen Proteinbanden noch ein sehr leichtes Verlaufen festgestellt werden. Da die Verwendung einzelner Additiven nicht zu quantitativen Markierungen führte, wurden im nächsten Optimierungsschritt auch Kombinationen der Additive getestet. Die Ansätze mit längerkettigen Ketonen wurden zusätzlich mit SDS versetzt. Da die vorherigen SDS-Ansätze schon eine fast vollständige Markierung generierten, wurde in weiteren Ansätzen die Konzentration erhöht. In den letzten beiden Ansätzen wurde einerseits zum Vergleich Triton X-100 als Additiv eingesetzt. Andererseits wurde SDS mit Harnstoff kombiniert, wobei der Harnstoff mit 4 M geringer konzentriert war als in den ursprünglichen Ansätzen. Das dazugehörige Gel ist in Abbildung 17 gezeigt.

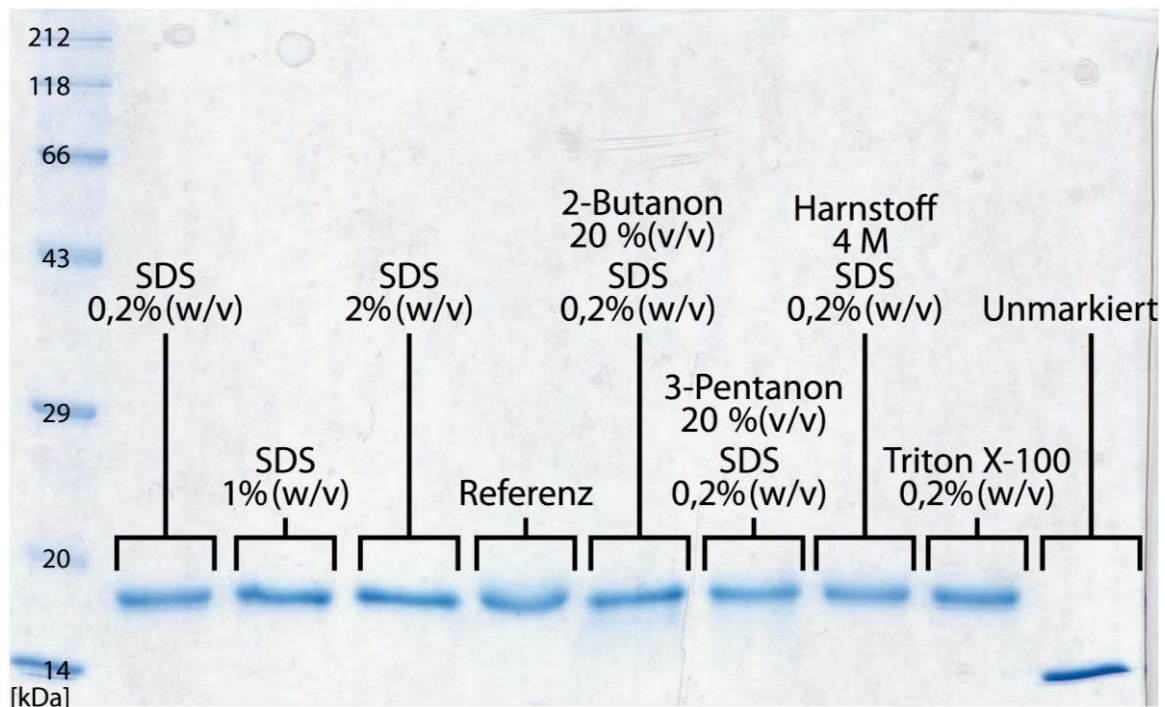


Abb. 17: Polyacrylamidgel von α -Lactalbumin für die neuen Optimierungsansätze. Neben einer Erhöhung der SDS-Konzentration wurden auch Kombinationen verschiedener Additive eingesetzt. Die Referenz entspricht den Referenzbedingungen, die in Abb. 14 verwendet wurden.

Die Kombination von Ketonen mit SDS führte zwar zu einer deutlich besseren Markierung als bei der ausschließlichen Verwendung der Ketone, jedoch war diese nach wie vor nicht vollständig. Mit Triton als Additiv konnten vergleichbare Ergebnisse wie bei SDS beobachtet werden, allerdings war bei 0,2 % (w/v) noch ein leichtes Verlaufen der Gelbande festzustellen. Die besten Ergebnisse konnten einerseits bei den Ansätzen mit höherer SDS-Konzentration (≥ 1 % (w/v)) und andererseits bei der Kombination von SDS mit Harnstoff generiert werden. Hier konnte kein Verlaufen der Gelbanden mehr festgestellt werden, was auf eine vollständige Markierung schließen lässt. Um die vollständige Markierung zu überprüfen, wurden die besten drei Experimente (1 % SDS (w/v); 2 % SDS (w/v); 0,2 % SDS (w/v), 4 M Harnstoff) erneut für α -Lactalbumin und zusätzlich für bovines Serumalbumin durchgeführt. Anschließend wurde eine Trypsinproteolyse im Polyacrylamidgel durchgeführt und die eluierten Peptide mittels nanoLC-ESI-FTICR-MS analysiert. Die Datenanalyse wurde anschließend mithilfe der Proteome Discoverer Software durchgeführt. In Tabelle 3 sind die cysteinhaltigen tryptischen Peptide von α -Lactalbumin mit dem jeweiligen Markierungsgrad in den verschiedenen Ansätzen aufgelistet.

Tab. 3: Auflistung der cysteinhaltigen tryptischen Peptide von α -Lactalbumin. Die Peptide wurden entsprechend ihrer Länge sortiert. Ein + bedeutet, dass das jeweilige Peptid ausschließlich in vollständig markierter Form gefunden wurde. Bei / konnte das Peptid im jeweiligen Ansatz nicht identifiziert werden. Die Prozentangaben beziehen sich auf w/v.

Cysteinhaltige tryptische Peptide	Referenz	4 M Harnstoff 0.2 % SDS	2 % SDS	1 % SDS
GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYD TQAIVQNNDSTEYGLFQINNK	/	/	/	/
DDQNPSSNICNISCDK	+	+	+	+
FLDDDLTDDIMCVK	+	+	+	+
LDQWLCEK	+	+	+	+
CEVFR	+	+	+	+
ALCSEK	/	+	+	+
IWCK	+	+	+	+

Ein tryptisches Peptid konnte vermutlich aufgrund seiner Länge in keinem der Ansätze identifiziert werden. In jedem der Ansätze wurden darüber hinaus ausschließlich vollständig markierte Peptide vom Proteome Discoverer identifiziert. Bei einer manuellen Überprüfung konnte jedoch bei dem Ansatz mit 1 % SDS (w/v) das Peptid mit der Sequenz DDQNPSSNICNISCDK auch in unmarkierter Form gefunden werden. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse des Proteome Discoverer bezüglich der Untersuchungen für bovines Serumalbumin aufgelistet.

Vermutlich aufgrund seiner geringen Größe konnte das Peptid DVCK ausschließlich in Form von Fehlsplaltungen der Protease (engl. *missed cleavages*) identifiziert werden. Bei 1 % SDS (w/v) wurde eines der Peptide sowohl in markierter als auch in unmarkierter Form identifiziert. Dies deckt sich mit der manuellen Auswertung für α -Lactalbumin, wo bei der gleichen SDS-Menge ebenfalls ein unmarkiertes Peptid identifiziert werden konnte. Daher ist die Zugabe von 1 % SDS (w/v) nicht ausreichend, um eine quantitative Markierung zu erhalten.

Tab. 4: Auflistung der cysteinhaltigen tryptischen Peptide vom bovinen Serumalbumin. Die Peptide wurden entsprechend ihrer Länge sortiert. Bei den mit * markierten Peptiden konnte das eigentliche Peptid nicht gefunden werden, jedoch ein Peptid mit Fehlsplaltung der Protease. Ein + bedeutet, dass das jeweilige Peptid ausschließlich in vollständig markierter Form gefunden wurde. Bei / konnte das Peptid im jeweiligen Ansatz nicht identifiziert werden. ~ bedeutet, dass das Peptid nur unvollständig markiert wurde. Die Prozentangaben beziehen sich auf w/v.

Cysteinhaltige tryptische Peptide	Referenz	4 M Harnstoff 0.2 % SDS	2 % SDS	1 % SDS
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	+	+	+	~
LFTFHADICTLPDTEK	+	+	+	+
RPCFSALTPDETYVPK	+	+	+	+
MPCTEDYLSLILNR	+	+	+	+
YNGVFQECCQAEDK	+	+	+	+
ECCHGDLLECADDR	+*	+	+	+
LKPDPNTLCDEFK	+	+	+	+
DDPHACYSTVFDK	+	+	+	+
EYEATLEECCA	+	+	+	+
YICDNQDTISSK	+	+	+	+
ETYGDMADCCCK	/	+	/	+
SLHTLFGDELCK	+	+	+	+
TCVADESHAGCEK	+	+	+	+
ECCDKPLLEK	+	+	+	+
CCTKPESER	+	+	+	+
EACFAVEGPK	+	+	+	+
CCTESLVNR	+	+	+	+
SHCIAEVEK	+	+	+	+
QNCDQFEK	+	+	+	+
NECFLSHK	+	+	+	+
LCVLHEK	+	+	+	+
CCAADDK	+	+	+	+
GACLLPK	+	+	+	+
CASIQK	+	+	+	+
DVCK	+*	+*	+*	+*

Bei den anderen Ansätzen mit 4 M Harnstoff und 0,2 % SDS (w/v) bzw. mit 2 % SDS (w/v) wurden ausschließlich MeCAT-markierte Peptide gefunden. Folglich ist die Markierung unter diesen beiden Bedingungen sowohl für α -Lactalbumin als auch für bovines Serumalbumin quantitativ. Allerdings ist die SDS-Konzentration bei 2 % SDS (w/v) sogar höher als die Konzentration bei der SDS-PAGE. Dies kann sich wiederum nachteilig auf die Handhabbarkeit

der Proben auswirken. Aus diesem Grund wurde die Markierung mit 4 M Harnstoff und 0,2 % SDS (w/v) als optimierte Markierungsreaktion gewählt. Zwar ist die Harnstoffkonzentration hier immer noch recht hoch, allerdings ist sie ein Drittel geringer als in den ursprünglichen Markierungsbedingungen. Darüber hinaus konnte vollständig auf Aceton als Additiv verzichtet werden, wodurch künftig Ungenauigkeiten durch Verdampfung vermieden werden können.

3.3 Vorstellung der *B. bacteriovorus* Proben

Die neuen Markierungsbedingungen mit beliebigem Puffer und SDS als Additiv erlaubten es, die MeCAT-Markierung im Puffer für die Lyse von *B. bacteriovorus* durchzuführen. Nachdem sowohl die Lyse als auch die Markierung an *B. bacteriovorus* angepasst und optimiert wurden, konnte die Quantifizierung der Proteine von *B. bacteriovorus* HD100 zu verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus durchgeführt werden. Dazu wurde von den Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe um JURKEVITCH von der *Hebrew-University of Jerusalem* ein Probensatz von vier verschiedenen Zeitpunkten im Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* bereitgestellt. Dies waren eine Probe mit AP-Zellen und drei Proben mit GP-Zellen. Die drei GP-Proben waren auf 1 h, 2 h und 3 h nach der Penetration des Wirts (*E. coli* K-12) synchronisiert. Nach LAMBERT *et al.* dauert ein Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* HD100 mit *E. coli* als Wirt etwa 4 h^[52]. Folglich ist der Lebenszyklus mit den vier Proben sehr breit abgedeckt (Vergleich hierzu auch Lebenszyklus im Kapitel 2.3 Abb. 3). Bei der Probe, die auf 1 h synchronisiert war, sollte die Bildung des Bdelloplasten gerade abgeschlossen sein und das Filamentwachstum eingesetzt haben. Bei 2 h sollte sich das Filamentwachstum dem Ende nähern. Und bei 3 h sollte das Zytoplasma des Wirts bereits aufgebraucht sein und das Aufspalten des Filaments in neue *B. bacteriovorus* Zellen eingesetzt haben. Zur Vereinfachung werden die drei GP-Proben in dieser Arbeit mit GP1h, GP2h und GP3h abgekürzt. Die vier *B. bacteriovorus* Proben wurden mithilfe der optimierten *Freeze-Thaw*-Lyse lysiert. Basierend auf einer kleineren Lyseoptimierung an *B. bacteriovorus* HD100 Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurde allerdings TRIS als Puffer verwendet und der pH-Wert auf 8,0 erhöht, da dies zu geringfügig höheren Proteinausbeuten führte. Um die bei der Lyse freigesetzten Proteasen zu inhibieren, wurde den Proben zusätzlich jeweils ein Inhibitorcocktail zugesetzt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford-Assay bestimmt. Die lysierten Proben

sollten nun relativ zueinander quantifiziert werden, um Unterschiede im Proteom zwischen den verschiedenen Phasen zu untersuchen.

3.4 Analyse der Proben mit MeCAT

In Vorversuchen zur MeCAT-Markierung von *B. bacteriovorus* (Ergebnisse nicht gezeigt) konnte eine Markierungseffizienz von etwa 70 % festgestellt werden, wobei jene Peptide, die markiert waren, nicht in unmarkierter Form gefunden wurden. Für die Komplexität der Probe ist dies ein akzeptabler Wert. Daher wurde die MeCAT-Strategie auf die Zeitpunktproben angewandt. Für die Markierung wurden die monoisotopischen Metalle Terbium, Holmium und Thulium und das annähernd monoisotopische Metall Lutetium gewählt. Nach der Markierung der vier Proben wurden diese gemischt. Da die verschiedenen Metallmarkierungen auf dem Gel nicht komigrieren^[117], wurde die Mischung mithilfe von Gelelektrophorese aufgereinigt, aber nicht aufgetrennt. Dazu wurde die Elektrophorese gestoppt, sobald die Mischung in das Trenngel eingetreten war. Um trotzdem eine ausreichende Trennung der Peptide für die massenspektrometrische Analyse zu gewährleisten, wurde die im Gel proteolytierte Probe mithilfe eines 8 h nanoLC-Gradienten aufgetrennt und mit ESI-FT-MS und MS/MS analysiert. Die relative Quantifizierung der Proben erfolgte durch die Signalintensitäten der Vorläuferionen. Die Ergebnisse der anschließenden Analyse mithilfe der Proteom Discoverer Software sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Es wurden 15 Proteine von *B. bacteriovorus* und 134 Proteine von *E. coli* identifiziert, wovon nur ein bzw. sieben Proteine auch quantifiziert wurden. Die niedrigen Identifizierungsraten zeigten, dass trotz 8 h LC-Gradienten die Auftrennung der komplexen Probe nicht ausreichend war. Daher wurden in den späteren Experimenten anstelle von sehr langen Gradienten orthogonale Trenntechniken zur Verbesserung der Auftrennung eingesetzt.

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse des MeCAT-Quantifizierungsansatzes für die vier Zeitpunktpuben. Für *B. bacteriovorus* wurden 15 Proteine identifiziert und davon 1 Protein quantifiziert und für *E. coli* wurden 134 identifiziert und 7 davon quantifiziert. Unten sind die potentiellen Ursachen für die niedrigen Quantifizierungsraten aufgelistet. *Sämtliche cysteinhaltigen Peptide, die unmarkiert identifiziert wurden, wurden nur mit geringer Sicherheit (engl. *low confidence*) identifiziert.

		<i>B. bacteriovorus</i> HD100	<i>E. coli</i> K-12
Identifizierte Proteine		15	134
Quantifizierte Proteine		1	7
Potentielle Ursache	Protein enthält kein Cystein	4	29
	Kein cysteinhaltiges Peptid identifiziert	6	50
	Markierung nur in einer Probe	1	18
	Cysteinhaltiges Peptid unmarkiert*	2	25
	Andere Gründe	1	5

Bei Betrachtung der potentiellen Ursachen für die sehr niedrigen Quantifizierungsraten, ergab sich jedoch noch ein weiteres grundlegendes Problem des gewählten Quantifizierungsansatzes. Die Markierung an Cysteinresten, welche eine relativ geringe biologische Abundanz aufweisen^[118] und deshalb im ursprünglichen MeCAT-Ansatz als Markierungsposition gewählt wurden^[119], um die Komplexität im ICP-MS zu verringern, erweist sich hier als großer Nachteil. Einerseits enthält ein Viertel der identifizierten Proteine gar keine Cysteinreste und kann somit nicht quantifiziert werden. Andererseits besitzen selbst jene Proteine, die Cysteinreste enthalten, meist nur sehr wenige Cysteinreste. Daher müssen für eine erfolgreiche Quantifizierung des Proteins die wenigen tryptischen Peptide, die Cysteinreste enthalten, identifiziert werden. Dadurch ist gerade auch bei niedrigabundanten Proteinen, die dementsprechend oft mit niedriger Sequenzabdeckung identifiziert werden, die Chance groß, dass diese aufgrund des Fehlens von cysteinhaltigen Peptiden nicht quantifiziert werden können. In Tabelle 5 spiegelt sich dies darin wider, dass fast die Hälfte der Proteine nicht quantifiziert wurde, obwohl diese cysteinhaltig sind. Aus diesen Gründen

ist es für eine breit angelegte Proteinquantifizierung einer komplexen biologischen Probe sinnvoller, die Markierung an einem abundanteren Aminosäurerest durchzuführen.

3.5 Analyse der Proben mit ICPL

Als alternativer Aminosäurerest für die Markierung der *B. bacteriovorus* Proben wurde die Aminfunktion von Lysinresten gewählt, welche eine deutlich größere Häufigkeit als Cysteinreste aufweisen. Zwar gibt es bereits erste erfolgreiche Experimente zu einem MeCAT-Reagenz, welches an Aminfunktionen bindet, jedoch nur für Modellproteine, die zuvor an Resin gebunden wurden^[103]. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der komplexen Proben eine etablierte Isotopenmarkierungsstrategie gewählt. Als Strategie wurde hierfür die auf einer NHS-Markierung basierende ICPL-Strategie gewählt (Vgl. Kapitel 2.7). In Tabelle 6 sind die Summenformeln und die Massendifferenzen der vier auf Nikotinsäure basierenden Markierungsreagenzien aufgelistet.

Tab. 6: Summenformeln und monoisotopische bzw. Deltamassen der vier ICPL-Reagenzien.

	ICPL_0	ICPL_4	ICPL_6	ICPL_10
Summenformel der Reagenzien	$^{12}\text{C}_6^1\text{H}_4\text{NO}$	$^{12}\text{C}_6\text{D}_4\text{NO}$	$^{13}\text{C}_6^1\text{H}_4\text{NO}$	$^{13}\text{C}_6\text{D}_4\text{NO}$
Monoisotopische Masse [Da]	106,0293	110,0544	112,0494	116,0745
Deltamasse	4,0251 Da		1,9950 Da	4,0251 Da

Die Markierung der *B. bacteriovorus* Proben erfolgte nach dem Protokoll des Kits (Vgl. Materialien und Methoden). Da es sich bei ICPL um eine Isotopenmarkierungsstrategie handelt, haben die vier Reagenzien keinen negativen Einfluss auf die Komigration der differentiell markierten Proteine. Daher wurde die Mischung der vier differentiell markierten Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abbildung 18 ist der Arbeitsablauf für die Probenvorbereitung der vier *B. bacteriovorus* Proben noch einmal veranschaulicht. Weiterhin ist auch das Polyacrylamidgel mit den ausgeschnittenen Gelbanden von einem der Ansätze zu sehen.

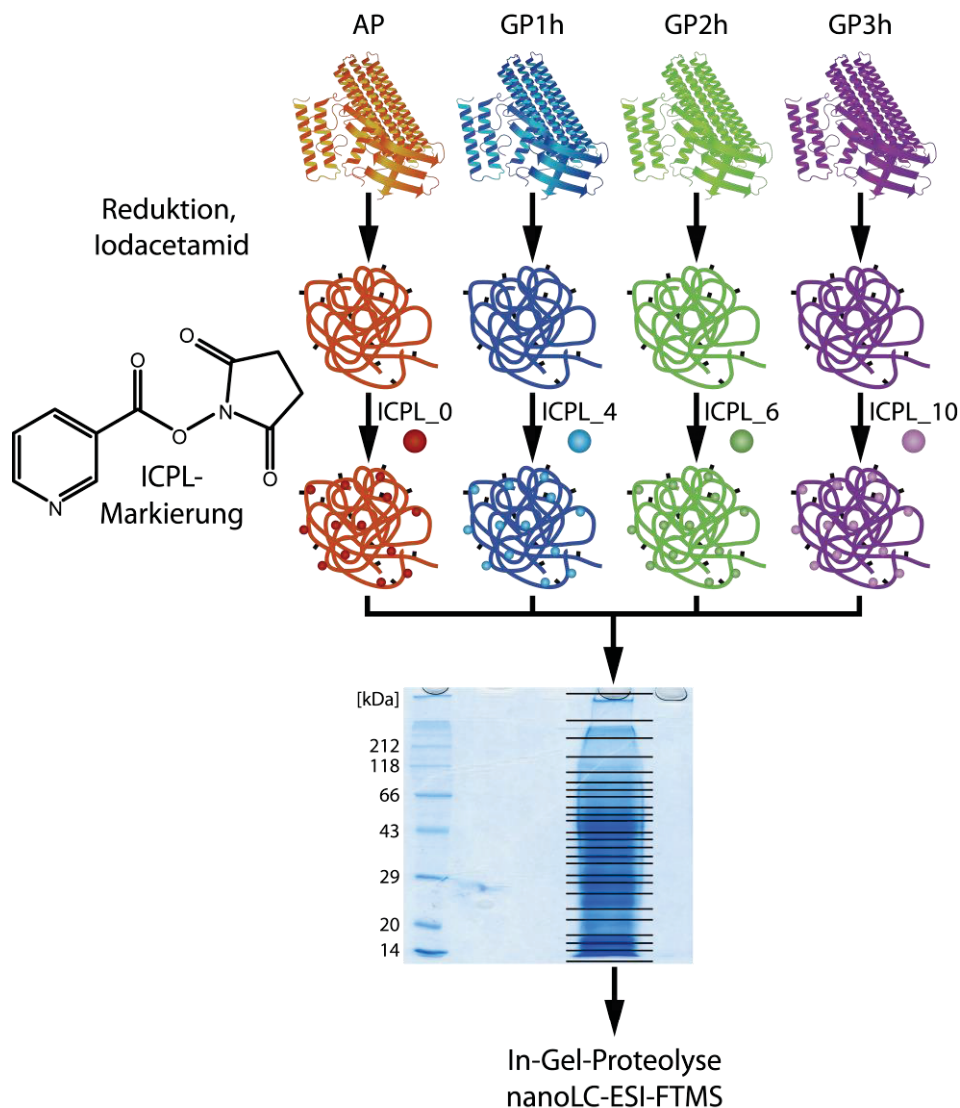


Abb. 18: Veranschaulichung des Arbeitsablaufes für die Probenvorbereitung der vier *B. bacteriovorus* Proben nach dem ICPL-Protokoll. Da der Probenpuffer Guanidinhydrochlorid enthielt, wurde die vereinte Probe vor der Gelelektrophorese über eine Acetonfällung aufgereinigt. Bei dem Gel handelt es sich um das Polyacrylamidgel eines der Ansätze, wobei die ausgeschnittenen Gelbanden eingezeichnet sind.

Nach der Gelelektrophorese wurde eine In-Gel-Proteolyse durchgeführt. Da der NHS-Ester der ICPL-Reagenzien an Lysinreste bindet, inhibiert er die Proteolyse durch Trypsin an diesen Stellen, wodurch die Protease nur nach Arginin spaltet. Dies wiederum könnte sich nachteilig auf die Identifizierungsausbeuten auswirken. LEROY *et al.* konnten in ihrem Artikel von 2010 nachweisen, dass sich die Identifizierungsausbeuten und damit auch die Quantifizierungsausbeuten von ICPL-markierten Proteinen signifikant steigern lassen, wenn für die Proteolyse die Proteasen Trypsin und Glu-C kombiniert werden^[120]. Folglich wurden die Proben nach der Proteolyse mit Trypsin noch einmal mit Glu-C proteolysiert. Nach der Proteolyse wurden die Gelfractionen mittels nanoLC-ESI-FTMS analysiert, wobei jeweils ein

120 min nanoLC-Gradient gewählt wurde, um eine ausreichende Trennung zu gewährleisten. Insgesamt wurden vier technische Replikate durchgeführt.

Anwendung von ICPL auf Peptidebene

Die ICPL-Markierung wurde in einem Teil der Ansätze auch auf Peptidebene durchgeführt. Obschon die ICPL-Strategie ursprünglich für die Proteinmarkierung konzipiert und validiert wurde, gibt es vom Anbieter auch ein Protokoll für die Markierung auf Peptidebene. Ein Vorteil der Markierung auf Peptidebene ist, dass die Proteolyse mit Trypsin durchgeführt werden kann. Da infolge der Trypsinproteolyse mit jedem tryptischen Peptid ein neuer *N*-Terminus entsteht, muss die Menge an ICPL-Reagenz für jede Probe verdoppelt werden. Infolge der *N*-Terminusmarkierung kann jedoch auch jedes tryptische Peptid für die Proteinquantifizierung genutzt werden. Folglich sollte die Markierungsstrategie auf Peptidebene höhere Quantifizierungsausbeuten als die Markierung auf Proteinebene liefern. Infolge der Proteolyse lässt sich die vereinigte Probe nicht mehr gelelektrophoretisch auftrennen. Stattdessen wurde für die Peptidmischung eine SCX-Fraktionierung als orthogonale Trennmethode zur Umkehrphasen-HPLC verwendet. In Abbildung 19 ist der Arbeitsablauf der Markierungsstrategie auf Peptidebene noch einmal veranschaulicht. Weiterhin ist auch das SCX-Chromatogramm des ersten Replikates zu sehen.

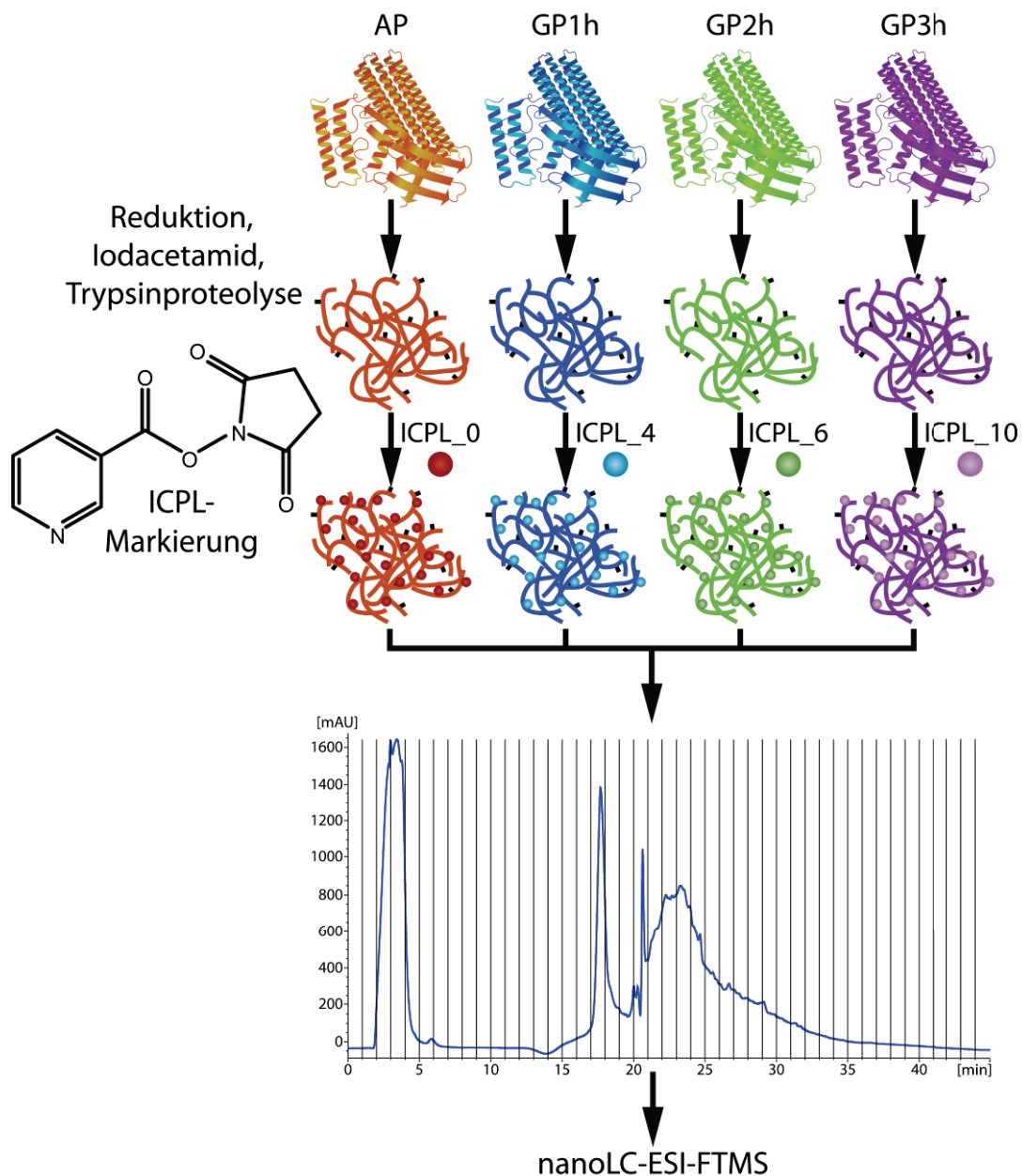


Abb. 19: Veranschaulichung des Arbeitsablaufes für die Probenvorbereitung der vier *B. bacteriovorus* Proben nach dem ICPL-Protokoll mit Markierung auf Peptidebene. Bei dem SCX-Chromatogramm handelt es sich um die Fraktionierung des ersten Replikates. Die einzelnen Fraktionen sind durch die senkrechten Linien dargestellt. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214 nm.

Die SCX-Fraktionierungen wurden in Kooperation mit der Proteom Factory AG durchgeführt. Dabei wurde auf ein etabliertes System mit Kaliumchlorid als Fraktionierungssalz zurückgegriffen^[121]. Für spätere Replikate konnte die Trennleistung durch eine Modifikation des Gradienten verbessert werden (Vgl. Materialien und Methoden). Aufgrund der hohen Salzlast in den eingegangenen Fraktionen mussten diese vor der nanoLC-ESI-FTMS-Analyse zunächst noch entsalzt werden. Für die eigentliche massenspektrometrische Analyse wurden

die gleichen Bedingungen genutzt wie bei der Analyse der Proben, die auf Proteinebene markiert wurden. Es wurden für die Markierung auf Peptidebene drei technische Replikate durchgeführt.

Entwicklung einer Strategie zur Datenauswertung

Nach der massenspektrometrischen Analyse wurden sämtliche Replikate mithilfe der Proteome Discoverer Software ausgewertet. Für die Datenauswertung wurden nur jene Proteine berücksichtigt, bei denen mindestens zwei Peptide identifiziert wurden und die einen Score (Vergleich Kapitel 2.6) von mindestens 20 aufwiesen. Für die Identifizierung wurden die Replikate jeweils gegen aktuelle UniProt-Datenbanken von *B. bacteriovorus* HD100 und von *E. coli* K-12 analysiert. In Tabelle 7 sind die Identifizierungs- und Quantifizierungsquantitäten der Replikate auf Protein- und auf Peptidebene und die Gesamtmengen aufgelistet.

Tab. 7: Anzahl an identifizierten bzw. quantifizierten Proteinen von *B. bacteriovorus* HD100 und *E. coli* K-12. Die Identifizierungs- und Quantifizierungsquantitäten der Markierungsstrategien auf Peptid- und Proteinebene und die Gesamtmengen wurden gegenübergestellt.

		<i>B. bacteriovorus</i> HD100	<i>E. coli</i> K-12
Proteinebene	Identifizierte Proteine	914	1325
	Quantifizierte Proteine	307	544
Peptidebene	Identifizierte Proteine	1157	1447
	Quantifizierte Proteine	698	972
Gesamt	Identifizierte Proteine	1392	1843
	Quantifizierte Proteine	730	1002

Bei Betrachtung der identifizierten Proteine liefern die Markierungsstrategien auf Peptid- und auf Proteinebene ähnliche Zahlen. Die Zahl an quantifizierten Proteinen ist bei der Markierung auf Peptidebene jedoch deutlich größer. Dies ist nachvollziehbar, da auf Peptidebene sämtliche und nicht nur die lysinhaltigen Peptide zur Quantifizierung genutzt werden können. Allerdings müssen für Identifizierungsquantitäten, die mit der Markierung

auf Proteinebene vergleichbar sind, deutlich mehr SCX-Fractionen analysiert werden, was sowohl die Messzeit als auch die Datenmengen deutlich erhöht. Durch entsprechendes Ausschneiden der Gelbanden lassen sich abundantere und weniger abundante Proteinbanden relativ leicht für die Analyse trennen. Für die Markierung auf Peptidebene ist dies nicht möglich, wodurch für eine ausreichende Trennung von abundanten und niedrig-abundanten Peptiden lange Gradienten benötigt werden. Da es sich bei den Quantifizierungsergebnissen um Verhältnisse handelt, wurden die Daten logarithmisch mit dem natürlichen Logarithmus ausgewertet. Aufgrund der Menge an Proteinen war eine manuelle Datenauswertung der in den einzelnen Replikaten identifizierten und quantifizierten Proteine jedoch kaum umsetzbar. Daher wurden mit Hilfe von Visual Basic Makros geschrieben, um die Datenauswertung zu vereinfachen (Quellcode in Materialien und Methoden, Kapitel „Datenauswertung“). So wurde von jenen Quantifizierungsverhältnissen eines Proteins, die in mehreren Replikaten bestimmt werden konnten, mithilfe von Makros jeweils der Median bestimmt. Mithilfe der Makros wurde ebenfalls die Streuung in Form von Variationskoeffizienten bestimmt. Die Replikate auf Peptid- und Proteinebene wurden gemeinsam betrachtet. Die Variationskoeffizienten waren nur in einem Viertel der Fälle unterhalb von 20 %. Allerdings handelt es sich bei den Proben um sehr komplexe Mischungen aus *B. bacteriovorus* HD100 und *E. coli* K-12, wodurch selbst Variationskoeffizienten von bis zu 100 % nachvollziehbar sind. Dies traf auf mehr als 80 % der Variationskoeffizienten zu.

Eine Herausforderung war nun, die Quantifizierungsdaten zu normieren. Zwar wurden die Gesamtproteinkonzentrationen in den einzelnen Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten des Lebenszyklus mithilfe von Bradford-Assay bestimmt und auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Da die Proben jedoch sowohl *B. bacteriovorus* als auch *E. coli* Zellen enthielten und es zu späteren Zeitpunkten des Lebenszyklus zur Bildung neuer *B. bacteriovorus* Zellen kommt, während die *E. coli* Konzentration immer weiter abnimmt, ist der Anteil an *B. bacteriovorus* bzw. *E. coli* Proteinen an der Gesamtproteinkonzentration in den verschiedenen Proben keineswegs konstant. Daher wurden Proteine für die Normierung der Quantifizierungsdaten gesucht. Da es bei *B. bacteriovorus* zur Neubildung von Zellen kommt, sollten nach Möglichkeit Proteine genutzt werden, deren Konzentration über den Lebenszyklus konstant ist. Für die Auswahl von Normierungsproteinen wurde auf Transkriptionsdaten zurückgegriffen. Es wurde angenommen, dass Proteine, deren RNA eine

über den Lebenszyklus konstante Transkription aufweist, auch eine konstante Proteinexpression aufweisen. In Zusammenarbeit mit AVIDAN aus der Arbeitsgruppe von JURKEVITCH konnten drei Proteine mit konstanter RNA-Transkription^[122] identifiziert werden (Vgl. Tab. 8). Die Quantifizierungsverhältnisse dieser drei Proteine wurden für die Normierung genutzt.

Anspruchsvoller gestaltete sich die Normierung der Quantifizierung bei den *E. coli* Proteinen. Da *B. bacteriovorus* die Proteine von *E. coli* als Substrat verwendet, mussten nach Möglichkeit Proteine gefunden werden, die während der GP von *B. bacteriovorus* nicht abgebaut werden, es konnten folglich keine zytoplasmischen Proteine genutzt werden. Stattdessen wurden hierfür äußere Membranproteine (Omp, engl. *outer membrane protein*) gewählt. Teile der äußeren Membran von *E. coli* können auch nach dem Verlassen des Wirts als leere Hülle gefunden werden. Daher bestand die Hoffnung, dass zumindest ein Teil der Omp annähernd konstant über den Lebenszyklus vorkommen. In Tabelle 8 sind die quantifizierten Omp von *E. coli* aufgelistet. Es konnten auch Lipoproteine der äußeren Membran quantifiziert werden, allerdings sind diese aufgrund der begrenzten Löslichkeit für die Normierung eher ungeeignet.

COVER *et al.* konnten OmpF auch noch nachweisen, nachdem *B. bacteriovorus* 109J den Wirt verlassen hatte, während OmpA erst ganz zum Ende des Lebenszyklus abnahm^[123]. Bei den hier durchgeführten Experimenten gab es allerdings relativ große Schwankungen in den Quantifizierungsverhältnissen von OmpF im Vergleich zu den anderen Omps. Daher wurden OmpF und die anderen Porenproteine OmpC und TolC nicht für die Normierung verwendet. Stattdessen wurden die drei Rezeptorproteine OmpA, OmpX und OmpP verwendet. Unter Einbeziehung aller Replikate der gewählten Proteine von *B. bacteriovorus* bzw. *E. coli* wurde für jedes Quantifizierungsverhältnis der Median gebildet, welcher anschließend für die Normierung der Quantifizierungsverhältnisse genutzt wurde.

Tab. 8: Normierungsproteine für *B. bacteriovorus* HD100 und quantifizierte Omp von *E. coli* K-12. Die farblich unterlegten Omp wurden für die Normierung genutzt. Die Accession-Nummer und die Proteinbeschreibung wurden der UniProt^[88]-Datenbank entnommen. Bei *B. bacteriovorus* wurde zusätzlich zur Accession-Nummer der zugehörige Genlokus mit angegeben.

	UniProt-Accession-Nummer (Genlokus)	UniProt-Proteinbeschreibung
<i>B. bacteriovorus</i> HD100	Q6MK08 (Bd2608)	Major anaerobically induced transmembrane protein OS=Bdellovibrio bacteriovorus GN=Bd2608
	Q6MK92 (Bd2517)	Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit OS=Bdellovibrio bacteriovorus GN=ahpC
	Q6MM43 (Bd1802)	High-potential iron-sulfur protein OS=Bdellovibrio bacteriovorus GN=Bd1802
<i>E. coli</i> K-12	P02930	Outer membrane protein TolC OS=Escherichia coli GN=tolC
	P02931	Outer membrane protein F OS=Escherichia coli GN=ompF
	P06996	Outer membrane protein C OS=Escherichia coli GN=ompC
	P0A910	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli GN=ompA
	P0A917	Outer membrane protein X OS=Escherichia coli GN=ompX
	P34210	Outer membrane protease OmpP OS=Escherichia coli GN=ompP

Nach der Normierung der Quantifizierungsdaten wurde bestimmt, welche Proteine im Lebenszyklus herauf- oder herabreguliert werden. Dazu wurden zunächst die Grenzen festgelegt, ab denen ein Protein als reguliert gilt. Da die Normierungsproteine über den Lebenszyklus konstant sein sollten, wurden diese für die Festlegung der Grenzen genutzt. Ein statistischer Ansatz, um die Regulierung eines Proteins zu bestimmen, ist der zweiseitige Welch-Test^[124]. Beim Welch-Test, welcher einen Spezialfall des t-Testes darstellt, wird überprüft, ob zwei Stichproben mit unterschiedlichen Varianzen der gleichen Grundgesamtheit angehören. Auf diese Weise kann überprüft werden, ob die Stichprobe der Quantifizierungswerte eines Proteins zur gleichen Grundgesamtheit wie die Quantifizierungswerte der Normierungsproteine gehören. Ist dies der Fall, wäre das Protein in diesem Quantifizierungsverhältnis nicht reguliert. Da beim Welch-Test die Varianzen beider Stichproben nicht gleich sind, müssen für jeden Test, d. h. für jeden Vergleich von

Quantifizierungsverhältnissen eines Proteins mit den Normierungsproteinen, die Freiheitsgrade berechnet werden (beim klassischen t-Test sind diese konstant). In Anbetracht der Anzahl an quantifizierten Proteinen (Vgl. Tab. 7) ist dies in der Praxis jedoch kaum umsetzbar. Zudem sind aufgrund der begrenzten Zahl an Replikaten für die meisten Proteine die Stichproben zu klein, um mit dem Welch-Test sinnvolle Ergebnisse zu erhalten. Daher wurde für die Festlegung der Regulierungsgrenzen ein anderer Ansatz gewählt. Durch Q-Q-Plots^[125] konnte eine annähernde Normalverteilung der logarithmischen Quantifizierungsergebnisse der Normierungsproteine festgestellt werden. In Abbildung 20 ist als Beispiel der Q-Q-Plot für das Verhältnis von GP3h zu GP2h dargestellt.

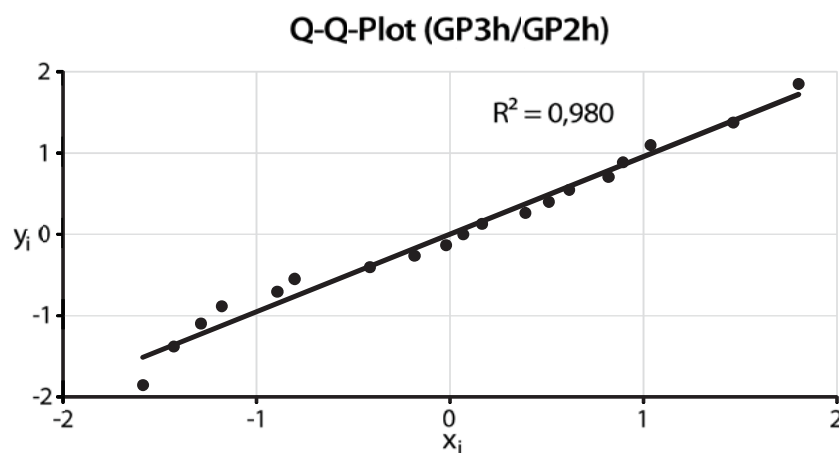


Abb. 20: Q-Q-Plot der logarithmischen Quantifizierungsergebnisse der Normierungsproteine über alle Replikate für das Verhältnis von GP3h zu GP2h. Die Daten wurden z-transformiert und die theoretischen Quantile nach BLOM bestimmt^[126]. x_i entspricht den experimentellen und y_i den theoretischen z-Werten. Aufgrund der Lage der Datenpunkte auf der Diagonalen kann auf eine Normalverteilung geschlossen werden.

Aufgrund der Normalverteilung sollten Quantifizierungsergebnisse, die größer bzw. kleiner als die dreifache Standardabweichung der Normierungsproteine sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht Teil dieser Grundgesamtheit und damit reguliert sein. Für die Berechnung der Grenzen wurden dabei einige sinnvolle Näherungen gemacht: Anstelle vom Mittelwert wurde aufgrund der kleinen Stichprobe der für Ausreißer tolerantere Median verwendet. Aus demselben Grund wurde die Standardabweichung über den MAD (engl. *median absolute deviation*) bestimmt. Der MAD beschreibt den Median der Abweichung der einzelnen Werte (x_i) einer Stichprobe vom Median und ist somit ein Maß für die Streuung.

Der MAD wird auch als Streumaß vom Proteome Discoverer genutzt:

$$MAD = Median(|x_i - Median(x)|) \quad (3)$$

Über einen empirischen Faktor k lässt sich der MAD in die Standardabweichung umrechnen. Für logarithmisch normalverteilte Stichproben ist k rund 1,4826^[127]. Über die Standardabweichung lassen sich anschließend die relativen Variationskoeffizienten von logarithmisch normalverteilten Daten bestimmen:

$$CV_{lognorm}(x) = \sqrt{e^{s(\ln x)^2} - 1} \quad (4)$$

Die obere Grenze ergibt sich aus dem Mittelwert der Quantifizierungswerte der Normierungsproteine und dem dreifachen ihrer Standardabweichung. Da der Variationskoeffizient auch über den Quotienten aus Standardabweichung und Mittelwert bzw. genähert dem Median berechnet werden kann, ergibt sich:

$$X_{up} = \bar{x} + 3s(x) \approx Median(x) + 3CV_{lognorm}(x) * Median(x) \quad (5)$$

Weil die Quantifizierungsdaten jedoch normiert sind, müssen auch die Grenzen normiert werden, also durch den Median geteilt werden. Die obere Grenze ist somit:

$$X_{up} = 1 + 3CV_{lognorm}(x) \quad (6)$$

Weil es sich um Verhältnisse handelt, ist die untere Grenze der Kehrwert der oberen Grenze:

$$X_{low} = \frac{1}{X_{up}} \quad (7)$$

Auf diese Weise konnten für jedes Quantifizierungsverhältnis eine obere und eine untere Grenze der Regulierung bestimmt werden. Die Grenzen der verschiedenen Verhältnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Auf Grundlage der Normierungsproteine festgelegte obere (X_{up}) und untere (X_{low}) Regulationsgrenzen. Da die AP-Probe kein *E. coli* enthielt, wurden diese Verhältnisse für *E. coli* nicht berücksichtigt.

<i>B. bacteriovorus</i> HD100			
	GP1h / AP	GP2h / GP1h	GP3h / GP2h
X_{up}	2,510	2,408	4,422
X_{low}	0,398	0,415	0,226
<i>E. coli</i> K-12			
	GP2h / GP1h	GP3h / GP2h	
X_{up}	1,699	1,765	
X_{low}	0,589	0,566	

Quantifizierungsergebnisse von *B. bacteriovorus*

Die Quantifizierungsverhältnisse der Proteine in den Proben wurden nun mit den berechneten Grenzwerten verglichen, um festzustellen, welche Proteine zu welchem Zeitpunkt des Lebenszyklus reguliert werden. Von den 730 quantifizierten Proteinen von *B. bacteriovorus* HD100 (Vgl. Tab. 7) wurden 522 berücksichtigt. Bei den restlichen Proteinen konnte aufgrund von fehlenden Quantifizierungskanälen keine sinnvolle Aussage über die Regulierung getroffen werden. Von den 522 ausgewerteten Proteinen waren 359 konstant über den Lebenszyklus, während 163 in irgendeiner Form reguliert wurden. Tabelle 10 ist eine ausführliche Auflistung der regulierten Proteine. Zusätzlich wurden für jedes regulierte

Protein die vermutete Funktion und die vermutete Lokalisierung in der Zelle aufgeführt. Hierfür wurden einerseits die UniProt-Datenbank^[88] und andererseits für den Fall, dass keine UniProt-Information für das Protein verfügbar waren, die GeneOntology-Datenbank^[128, 129] genutzt. Es wurden nur jene Proteine aufgelistet, die in all ihren Quantifizierungsverhältnissen in mehreren Replikaten quantifiziert wurden. Zusätzlich dazu konnten 5 Proteine identifiziert werden, die zwar nicht quantifiziert wurden, die aber in allen Replikaten, in denen sie identifiziert wurden, mit nur einer Markierungsart gefunden wurden. Dies spricht dafür, dass das Protein nur in der dazugehörigen Phase des Lebenszyklus existiert. Daher wurden diese Proteine ebenfalls in die Tabelle aufgenommen. Eine vollständige Auflistung aller 522 auswertbaren Proteine inklusive ihrer Quantifizierungsverhältnisse ist im Anhang zu finden (Anhang Tab. A1).

Tab. 10: Regulierte Proteine von *B. bacteriovorus* HD100, bei denen sämtliche Quantifizierungsverhältnisse in mindestens 2 Replikaten quantifiziert wurden. Mithilfe der UniProt^[88]- und der GeneOntology^[128, 129]-Datenbank wurden für jedes Protein die Lokalisierung in der Zelle und die Funktion (jeweils in Englisch) herausgesucht. Die Bezeichnungen Up und Down beschreiben eine Hoch- bzw. Herabregulierung des jeweiligen Proteins. Proteine mit gleicher Regulierung wurden farbig markiert. ¹Bei diesen Proteinen erfolgte die Zuordnung der Regulierung darüber, dass diese nur mit einer Markierungsart identifiziert wurden.

Genlokus	Accession	Beschreibung	Lokalisierung	Funktion (Prozess, Ligand)	Art der Regulierung
Bd0163	Q6MRC5	YdiY protein GN=ydiY	Unknown	Unknown	AP Up
Bd0427	Q6MQN4	Uncharacterized protein GN=Bd0427	Membrane	Unknown	AP Up
Bd0683	Q6MQ04	Glycine cleavage system H protein GN=gcvH	Unknown	(Glycine cleavage complex)	AP Up ¹
Bd0829	Q6MPL9	Uncharacterized protein GN=Bd0829	Membrane	Unknown	AP Up ¹
Bd1235	Q6MNL3	Uncharacterized protein GN=Bd1235	Unknown	Unknown	AP Up ¹
Bd2509	Q6MKA0	Uncharacterized protein GN=Bd2509	Unknown	Unknown	AP Up ¹
Bd1608	Q6MML9	Molybdopterin oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit GN=hmoA	Unknown	Oxidoreductase activity	AP Down
Bd2001	Q6MLK7	YCE I like family protein GN=Bd2001	Unknown	Unknown	AP Down
Bd2005	Q6MLK3	Uncharacterized protein GN=Bd2005	Membrane	Unknown	AP Down
Bd2675	Q6MJU3	Putative membrane protein with protease subunit GN=Bd2675	Membrane	Peptidase activity	AP Down

Bd2727	Q6MJP3	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA	Unknown	Isomerase (gluconeogenesis; glycolysis)	AP Down
Bd2950	Q6MJ36	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha GN=rpoA	Unknown	Nucleotidyltransferase ; Transferase (Transcription)	AP Down
Bd2972	Q6MJ18	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein; (RNA-binding; rRNA-binding)	AP Down
Bd3000	Q6MIZ4	Uncharacterized protein GN=Bd3000	Membrane	Unknown	AP Down
Bd3861	Q6MGR3	Pyruvate carboxylase GN=Bd3861	Unknown	Biotin carboxylase activity; Pyruvate carboxylase activity (Metal ion binding; ATP binding)	AP Down
Bd3897	Q6MGM7	ATP synthase subunit beta GN=atpD	Cytoplasmic membrane	Hydrolase (ATP synthesis; Hydrogen ion transport; Ion transport; Transport; ATP-binding; Nucleotide-binding)	AP Down
Bd0022	Q6MRQ2	Electron transfer flavoprotein beta-subunit GN=etfB	Unknown	Electron carrier activity	AP Down
Bd3424	Q6MHW0	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] GN=glmS	Cytoplasm	Aminotransferase; Transferase	AP Down
Bd0294	Q6MR07	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein GN=Bd0294	Unknown	Hydrolase activity	AP Down
Bd0356	Q6MQV0	Putative arginase GN=Bd0356	Unknown	Agmatinase activity (Metal ion binding)	AP Down
Bd0458	Q6MQK8	Valine-tRNA ligase GN=valS	Cytoplasm	Aminoacyl-tRNA synthetase; Ligase (Protein biosynthesis; ATP-binding; Nucleotide-binding)	AP Down
Bd0586	Q6MQ93	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2 GN=elb	Unknown	Unknown	AP Down
Bd1054	Q6MP15	Asparagine-tRNA ligase GN=asnS	Cytoplasm	Asparagine-tRNA ligase activity (ATP binding; Nucleic acid binding)	AP Down
Bd2212	Q6ML11	Uncharacterized protein GN=Bd2212	Membrane	Unknown	AP Down
Bd2577	Q6MK36	Uncharacterized protein GN=Bd2577	Unknown	Unknown	AP Down
Bd2751	Q6MJM2	Urocanate hydratase GN=hutU	Cytoplasm	Urocanate hydratase activity	AP Down
Bd3020	Q6MIX5	Flagellar motor protein MotB GN=motB	Membrane	Unknown	AP Down

Bd3048	Q6MIV0	Chaperone protein ClpB GN=clpB	Cytoplasm	Chaperone (Stress response; <i>ATP-binding, Nucleotide-binding</i>)	AP Down
Bd3058	Q6MIU0	Efflux transporter GN=noIG	Membrane	Transporter activity	AP Down
Bd3178	Q6MIH9	Aconitate hydratase GN=acnA	Unknown	Aconitate hydratase activity (<i>4 Iron, 4 Sulfur cluster binding</i>)	AP Down
Bd3617	Q6MHD3	Superoxide dismutase GN=sodB	Unknown	Oxidoreductase (<i>Metal-binding</i>)	AP Down
Bd3749	Q6MH16	Lon protease GN=lon	Cytoplasm	Hydrolase; Protease; Serine protease (<i>Stress response; ATP-binding; Nucleotide-binding</i>)	AP Down
Bd0974	Q6MP89	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase GN=Bd0974	Unknown	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring) activity	GP1h Up
Bd1509	Q6MMW4	Type IV pilus biogenesis protein PilB GN=pilB	Unknown	Protein transporter activity (<i>ATP binding</i>)	GP1h Up
Bd1606	Q6MMM1	Probable cytochrome C-type biogenesis protein GN=Bd1606	Membrane	(<i>Heme binding</i>)	GP1h Up
Bd3736	Q6MH27	Uncharacterized protein GN=Bd3736	Unknown	Holo-[acyl-carrier-protein] synthase activity (<i>Magnesium ion binding</i>)	GP2h Up ¹
Bd1835	Q6MM13	Acetyl-CoA acyltransferase GN=Bd1835	Unknown	Acetyl-CoA C-acyltransferase activity	GP2h Down
Bd0585	Q6MQ94	D-alanine–D-alanine ligase GN=ddl	Cytoplasm	Ligase (Cell shape; Cell wall biogenesis/degradation; Peptidoglycan synthesis; <i>ATP-binding; Magnesium; Manganese; Metal-binding; Nucleotide-binding</i>)	GP3h Up
Bd2175	Q6ML46	Uncharacterized protein GN=Bd2175	Unknown	Unknown	GP3h Up
Bd2502	Q6MKA5	2-methylisocitrate lyase GN=prpB	Unknown	Lyase (<i>Magnesium; Metal-binding</i>)	GP3h Up
Bd2707	Q6MJR2	Ribosome-binding ATPase YchF GN=yhf	Unknown	(<i>ATP-binding; Nucleotide-binding</i>)	GP3h Up
Bd3052	Q6MIU6	Flagellin GN=flgL	Secreted, Flagellum	Structural molecule activity	GP3h Up
Bd1467	Q6MMZ9	30S ribosomal protein S20 GN=rpsT	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein; RNA-binding; rRNA-binding	GP3h Down
Bd0459	Q6MQK7	Uncharacterized protein GN=Bd0459	Unknown	Unknown	AP, GP1h Up

Bd3081	Q6MIR8	NADH dehydrogenase I chain G GN=nuoG	Membrane	Electron carrier activity; NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity (<i>Iron-sulfur cluster binding; Metal ion binding</i>)	AP, GP1h Up
Bd3311	Q6MI59	Aspartate-tRNA(Asp/Asn) ligase GN=aspS	Cytoplasm	Aminoacyl-tRNA synthetase; Ligase (Protein biosynthesis; <i>ATP-binding; Nucleotide-binding</i>)	AP, GP1h Up
Bd0063	Q6MRL4	Uncharacterized protein GN=Bd0063	Membrane	Unknown	AP, GP1h Up
Bd3532	Q6MHK9	Uncharacterized protein GN=Bd3532	Unknown	(<i>Metal ion binding</i>)	AP, GP1h Up
Bd0112	Q6MRH2	Putative pilus assembly membrane protein GN=PilQ	Membrane	(Protein secretion)	AP, GP1h Up
Bd2726	Q6MJP4	Uncharacterized protein GN=Bd2726	Membrane	Unknown	AP, GP1h Up

Für einen großen Teil der regulierten Proteine sind bisher weder die Funktion noch die Lokalisierung bekannt. Insbesondere die Proteine, die in AP hochreguliert sind, sind, abgesehen vom *Glycine cleavage system H protein* (Bd0683), bisher nicht charakterisiert worden. Dies macht eine Interpretation der Daten schwierig. Die meisten Proteine werden zwischen AP und GP reguliert, während innerhalb der verschiedenen GP-Proben eher weniger Fluktuation auftritt. Viele der regulierten Proteine sind darüber hinaus in der Membran lokalisiert. So wird bei zwei der in AP hochregulierten, nicht-charakterisierten Proteine eine Lokalisierung in der äußeren Membran vermutet. Sowohl die stärkere Fluktuation zwischen AP und GP als auch die Proteinlokalisierung in der Membran stehen im Einklang zu den Erkenntnissen zur Lebensweise von *B. bacteriovorus*. Während der AP sind einige Proteine herabreguliert, die mit der RNA- und der Proteinexpression oder mit der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese in Verbindung stehen. Auch dies ist nachvollziehbar, da *B. bacteriovorus* in der GP das Zytoplasma seines Wirtes als Substrat für diese Prozesse nutzt. Nur zwei der Proteine werden in GP2h reguliert. Da sich *B. bacteriovorus* 2 h nach der Penetration mitten in der GP befindet, sollte es auch keine großen Unterschiede im Proteinmuster im Vergleich zu GP1h bzw. GP3h geben.

Die in den verschiedenen GP-Proben regulierten Proteine weisen diverse Funktionen auf. Interessant ist beispielsweise, dass 3 h nach der Wirtspenetration, also kurz vor Abschluss eines Lebenszyklus, ein Flagellinprotein (Bd3052) hochreguliert ist. Zu diesem Zeitpunkt sollte

sich *B. bacteriovorus* gerade in neue AP Zellen aufspalten, was den Anstieg in der Flagellinexpression erklären könnte. Das *Flagellar motor protein MotB* (Bd3020) wurde andererseits jedoch als in AP herabreguliert identifiziert, was nicht wirklich erklärt werden kann. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass das *Putative pilus assembly membrane protein* (Bd0112) in AP und GP1h hochreguliert wird. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass *B. bacteriovorus* Type IV Pili für die Wirtspenetration nutzt.

Quantifizierungsergebnisse von *E. coli*

Die Grenzwerte für die Regulierung wurden ebenfalls auf die Quantifizierungsverhältnisse vom Wirt *E. coli* K-12 angewendet. Von den 1002 quantifizierten Proteinen waren 837 auswertbar. Da die Wirtsproteine von *B. bacteriovorus* zersetzt werden, sollten die meisten Proteinkonzentrationen in der Probe 2 h nach der Penetration geringer sein als 1 h nach der Penetration. 3 h nach der Penetration sollte das Wirtszytosplasma bereits aufgebraucht und die *E. coli* Zelle getötet worden sein. Folglich kann auch keine Proteinbiosynthese mehr stattfinden. In Tabelle 11 sind die mit den Grenzwerten bestimmten Regulierungen der *E. coli* Proteine zusammengefasst.

Tab. 11: Zusammenfassung der regulierten *E. coli* Proteine auf Grundlage der über die Normierungsproteine bestimmten Grenzwerte.

Mit den Grenzwerten auswertbare Proteine	837
Über alle Zeitpunkte konstante Proteine	473
2 h nach der Penetration hochregulierte Proteine	52
3 h nach der Penetration hochregulierte Proteine	228
Herabregulierte Proteine	84

Von den 837 auswertbaren Proteinen waren nur 84 in irgendeiner Weise herabreguliert. Bei mehr als der Hälfte der Proteine gab es keine Mengenunterschiede in den drei GP-Proben. 52 Proteine waren 2 h nach der Penetration hochreguliert, während 228 Proteine sogar 3 h nach der Penetration hochreguliert sind. Da 3 h nach der Penetration *E. coli* bereits getötet worden sein sollte, ist eine solche Beobachtung kaum möglich. Auch, dass mehr als die Hälfte der Proteine konstant sind und damit nicht von *B. bacteriovorus* zersetzt werden, ist unerwartet. Das lässt vermuten, dass die gewählten Normierungsproteine nicht über den Lebenszyklus

konstant und damit nicht für die Normierung geeignet sind. Folglich scheinen die Proteinkonzentrationen in den als konstant identifizierten Proteinen mit gleicher Geschwindigkeit wie die Konzentrationen der Normierungsproteine abzunehmen, während die vermeintlich hochregulierten Proteine vermutlich nur langsamer in ihrer Konzentration abnehmen als die Normierungsproteine. Auch mit anderen Omp als Normierungsproteine konnte kein anderes Ergebnis beobachtet werden. Folglich sind die Omp für die Normierung ungeeignet, wodurch sich die *E. coli* Quantifizierungsdaten nicht sinnvoll normieren lassen. Aus diesem Grund wurde die Dateninterpretation bei *E. coli* eher qualitativ durchgeführt. Obschon sich aufgrund der fehlenden Normierung keine quantitative Aussage über die Proteinregulierung treffen lässt, lässt sich zumindest eine Aussage darüber treffen, welche Proteine schneller als andere abgebaut werden. So werden die herabregulierten Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit schneller bzw. stärker herabreguliert als die vermeintlich hochregulierten Proteine. Aus diesem Grund wurden in Tabelle 12 38 herabregulierte Proteine aufgelistet, wobei unterschieden wurde, in welcher Phase sie herabreguliert, also vermutlich stärker abgebaut, wurden. Es wurden wiederum nur Proteine berücksichtigt, die in mehreren Replikaten quantifiziert wurden.

Tab. 12: Auflistung der Proteine von *E. coli* K-12, die vermutlich am stärksten bzw. am schnellsten abgebaut werden. Mithilfe der UniProt^[88]- und der GeneOntology^[128, 129]-Datenbank wurden für alle Proteine die Lokalisierung in der Zelle (in Englisch) aufgelistet.

Genlokus	Accession	Beschreibung	Lokalisierung	Herabreguliert zwischen Phasen
b0438 JW0428	P0A6H1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX coli GN=clpX	Cytosol	GP1h / GP2h
b3984 JW3947	P0A7L0	50S ribosomal protein L1 coli GN=rplA	Cytosol	GP1h / GP2h
b2620 JW2601	P0A832	SsrA-binding protein coli GN=smpB	Cytosol	GP1h / GP2h
b0623 JW0618	P0A972	Cold shock-like protein CspE coli GN=cspE	Cytosol	GP1h / GP2h
b1237 JW1225	P0ACF8	DNA-binding protein H-NS coli GN=hns	Cytosol	GP1h / GP2h
b3307 JW3269	P0AG59	30S ribosomal protein S14 coli GN=rpsN	Cytosol	GP1h / GP2h
b3980 JW3943	P0CE48	Elongation factor Tu 2 coli GN=tufB	Cytosol	GP1h / GP2h
b0163 JW0159	P62768	UPF0325 protein YaeH coli GN=yaeH	Unknown	GP1h / GP2h
b1480 JW5962	P68191	Stationary-phase-induced ribosome-associated protein coli GN=sra	Cytosol	GP1h / GP2h
b4355 JW4318	P02942	Methyl-accepting chemotaxis protein I coli GN=tsr	Cytoplasmic membrane	GP2h / GP3h
b4036 JW3996	P02943	Maltoporin coli GN=lamB	Membrane	GP2h / GP3h
b4382 JW4345	P07650	Thymidine phosphorylase coli GN=deoA	Cytosol	GP2h / GP3h

b3225 JW3194	P0A6L4	N-acetylneuraminate lyase coli GN=nanA	Cytosol	GP2h / GP3h
b2926 JW2893	P0A799	Phosphoglycerate kinase coli GN=pgk	Cytosol	GP2h / GP3h
b3986 JW3949	P0A7K2	50S ribosomal protein L7/L12 coli GN=rplL	Cytosol	GP2h / GP3h
b1089 JW1075	P0A7N4	50S ribosomal protein L32 coli GN=rpmF	Cytosol	GP2h / GP3h
b1717 JW1707	P0A7Q1	50S ribosomal protein L35 coli GN=rpmI	Cytosol	GP2h / GP3h
b0436 JW0426	P0A850	Trigger factor coli GN=tig	Cytosol	GP2h / GP3h
b3833 JW5581	P0A887	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE coli GN=ubiE	Unknown	GP2h / GP3h
b2498 JW2483	P0A8F0	Uracil phosphoribosyltransferase coli GN=upp	Cytosol	GP2h / GP3h
b0411 JW0401	P0A927	Nucleoside-specific channel-forming protein tsx coli GN=tsx	Membrane	GP2h / GP3h
b4401 JW4364	P0A9Q1	Aerobic respiration control protein ArcA coli GN=arcA	Cytosol	GP2h / GP3h
b3336 JW3298	P0ABD3	Bacterioferritin coli GN=bfr	Cytosol	GP2h / GP3h
b2414 JW2407	P0ABK5	Cysteine synthase A coli GN=cysK	Cytosol	GP2h / GP3h
b0434 JW0424	P0ADA5	Uncharacterized lipoprotein YajG coli GN=yajG	Cytoplasmic membrane	GP2h / GP3h
b2672 JW2647	P0ADQ7	Uncharacterized protein YgaM coli GN=ygaM	Cytosol	GP2h / GP3h
b3509 JW5669	P0AET2	Acid stress chaperone HdeB coli GN=hdeB	Periplasm	GP2h / GP3h
b4376 JW4338	P0AFH8	Osmotically-inducible protein Y coli GN=osmY	Membrane	GP2h / GP3h
b0394 JW0385	P23917	Fructokinase coli GN=mak	Cytosol	GP2h / GP3h
b1048 JW1035	P33136	Glucans biosynthesis protein G coli GN=mdoG	Periplasm	GP2h / GP3h
b3540 JW3509	P37313	Dipeptide transport ATP-binding protein DppF coli GN=dpp	Cytoplasmic membrane	GP2h / GP3h
b0655 JW5092	P37902	Glutamate/aspartate import solute-binding protein coli GN=gluI	Periplasm	GP2h / GP3h
b1376 JW1370	P37903	Universal stress protein F coli GN=uspF	Unknown	GP2h / GP3h
b0651 JW0646	P41409	Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase RihA coli GN=rhA	Cytosol	GP2h / GP3h
b0104 JW0101	P60560	GMP reductase coli GN=guaC	Cytosol	GP2h / GP3h
b2514 JW2498	P60906	Histidine-tRNA ligase coli GN=hisS	Cytosol	GP2h / GP3h
b0474 JW0463	P69441	Adenylate kinase coli GN=adk	Cytosol	GP2h / GP3h
b2417 JW2410	P69783	PTS system glucose-specific EIIA component coli GN=crr	Cytosol	GP2h / GP3h

Fast alle der vermutlich schneller abgebauten Proteine sind im Zytoplasma von *E. coli* lokalisiert. Insbesondere Proteine des Zytoplasms scheinen schneller abgebaut zu werden. Dies ist nachvollziehbar, da *B. bacteriovorus* das Zytoplasma seines Wirtes als Substrat nutzt und die gelösten Proteine des Zytoplasms besonders leicht zugänglich für die Enzyme von

B. bacteriovorus sind. Auch sechs Membranproteine werden schneller abgebaut, wobei jeweils drei der Proteine in der inneren (in Tab. 12 als *Cytoplasmic membrane* bezeichnet) bzw. der äußeren Membran (in Tab. 12 als *Membrane* bezeichnet) lokalisiert sind. Weiterhin sind auch drei der Proteine im periplasmatischen Raum, also den Raum, in den *B. bacteriovorus* sich nach der Wirtspenetration festsetzt, lokalisiert.

Als RENDULIC *et al.* das Genom von *B. bacteriovorus* HD100 charakterisierten, konnten sie 150 potentielle Proteasen identifizieren, wovon mindestens 12 vermutlich extrazellulär wirken^[49]. Aufgrund dieser Vielzahl an Proteasen, welche auch größtenteils noch nicht charakterisiert sind und die wahrscheinlich in einem komplexen System wirken, ist eine Aussage über die Selektivität bezüglich des Abbaus der Proteine des Wirtes sehr schwierig. So weisen die vermeintlich schneller abgebauten Proteine von *E. coli* eine Vielzahl von Funktionen auf. 7 der Proteine besitzen allerdings eine ATP-wechselwirkende Funktionalität, sodass ein bevorzugter Abbau von Proteinen, die mit dem ATP-Haushalt im Zusammenhang stehen, vermutet werden kann. Abgesehen von den ATP-bindenden Proteinen konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen einem bevorzugten Abbau und einer bestimmten Funktionalität beobachtet werden. So konnten ribosomale Strukturproteine und RNA-bindende Proteine genauso wie proteinbindende und Guanosintriphosphat (GTP) bindende Proteine identifiziert werden. Dementsprechend könnte für einen bevorzugten Abbau während der GP eher die von der Lokalisierung und Löslichkeit abhängige Zugänglichkeit als die Funktionalität der Proteine eine Rolle spielen.

3.6 Erweiterung der *B. bacteriovorus* Proben

Im Laufe der Forschung zu *B. bacteriovorus* konnten einige methodische Verbesserungen und neue Erkenntnisse gewonnen werden. So war es den Kooperationspartnern der Gruppe um JURKEVITCH möglich, die Synchronisation bei der Herstellung von *B. bacteriovorus* Zellen zu verbessern. Auf diese Weise war es möglich, Zellen, die auf 30 min nach der Penetration des Wirtes synchronisiert waren, zu gewinnen. Nach LAMBERT *et al.* sollte zu diesem Zeitpunkt gerade der Übergang in die GP erfolgen^[52]. Daher könnte die quantitative Analyse dieser Probe zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Proteine führen, die am Übergang zwischen AP und GP beteiligt sind. Eine weitere Erkenntnis, die JURKEVITCH *et al.* in jüngerer Zeit machten, ist, dass die AP nicht wie bisher angenommen eine einheitliche Phase des Lebenszyklus ist,

sondern vielmehr aus zwei Phasen zu bestehen scheint. So konnten genetische Expressionsunterschiede in frisch geschlüpften AP-Zellen (APy) im Vergleich zu älteren AP-Zellen festgestellt werden^[122]. Der bisher bekannte Lebenszyklus müsste demnach um eine Phase erweitert werden (Abb. 21).

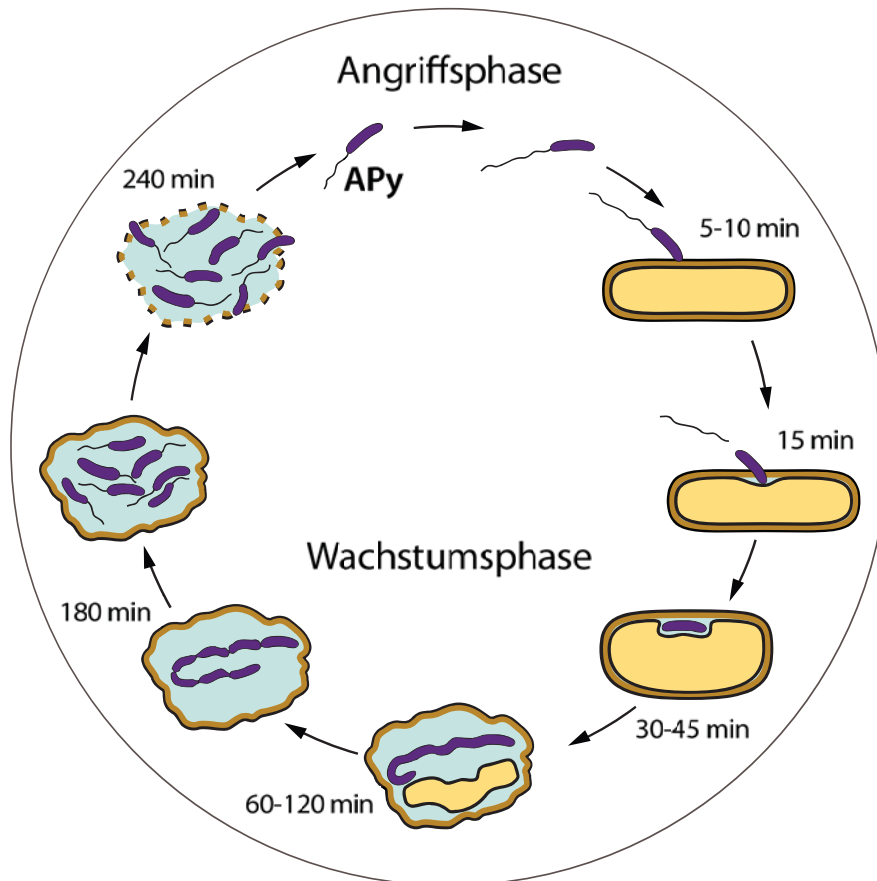


Abb. 21: Modifizierter Lebenszyklus von *B. bacteriovorus*. Auf Grundlage von Unterschieden in der Genexpression wird vermutet, dass die AP aus zwei Phasen besteht, einem jungen Stadium (APy) und einem reiferen Stadium^[122].

Aufgrund der neuen Erkenntnisse wurden neue quantitative Proteinanalysen von *B. bacteriovorus* Proben von vier Zeitpunkten des Lebenszyklus durchgeführt. Neben einer APy-Probe, wurde auch eine Probe 30 min nach der Penetration (GP0.5h) genutzt. Als Referenzproben wurden reguläre AP-Zellen und eine Probe 2 h nach der Penetration (GP2h) gewählt. Die Prozessierung und Lyse der Zellen erfolgte analog zu der bisherigen Probe (Vgl. Kapitel 3.3).

Analyse der neuen Proben

Die Zelllysate wurden erneut mithilfe der ICPL-Strategie analysiert. Es wurden jeweils zwei Replikate auf Proteinebene und auf Peptidebene markiert. Das AP-Lysat wurde im 1 zu 1

Verhältnis mit einem *E. coli* K-12 Lysat gemischt, um diesen Quantifizierungskanal zusätzlich auch für *E. coli* zu nutzen. Die Vorbereitung und Aufreinigung des Probensatzes erfolgte analog zum vorherigen Probensatz (Vgl. Kapitel 3.5). Bei den Proben, die auf Peptidebene markiert wurden, wurde jedoch nicht mehr Kaliumchlorid für die SCX-Fraktionierung genutzt, um den Entsalzungsschritt zu umgehen. Stattdessen wurde das MS-kompatible Ammoniumformiat verwendet, welches bei der Trocknung der Fraktionen vollständig verdampft. Vor der Verwendung der SCX-Fraktionierung mit Ammoniumformiat wurde eine Gradientenoptimierung an Peptiden von bovinem Serumalbumin durchgeführt (Vgl. Materialien und Methoden). Auch die Datenanalyse mit der Proteome Discoverer Software erfolgte in Analogie zum bisherigen Ansatz. Insgesamt konnten 1.423 Proteine von *B. bacteriovorus* HD100 identifiziert und 857 quantifiziert werden. Von *E. coli* K-12 konnten 2.127 Proteine identifiziert und 1.288 quantifiziert werden. Die höheren Identifizierungs- und Quantifizierungszahlen im Vergleich zum ersten Probensatz trotz weniger Replikate lassen sich insbesondere auf die optimierte SCX-Trennung zurückführen. Darüber hinaus wurden die Replikate auf Peptidebene auch zweimal vermessen, um die geringere Replikatzahl auszugleichen.

Die Analyse der quantifizierten Proteine erfolgte ebenfalls in Analogie zum ersten Probensatz, d. h., es wurden die gleichen Normierungsproteine genutzt und die Grenzwerte für die Regulierung auf die gleiche Weise bestimmt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden für *E. coli* ebenfalls die gleichen Normierungsproteine genutzt, obschon diese für die Normierung nicht geeignet sind. Die Grenzverhältnisse für die Regulierung sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Auf Grundlage der Normierungsproteine festgelegte obere (X_{up}) und untere (X_{low}) Regulationsgrenzen. Bei K-12 handelt es sich um das reine *E. coli* K-12 Lysat.

<i>B. bacteriovorus</i> HD100			
	APy / AP	GP0.5h / AP	GP2h / GP0.5h
X_{up}	2,354	3,711	4,767
X_{low}	0,425	0,269	0,210
<i>E. coli</i> K-12			
	GP0.5h / K-12	GP2h / GP0.5h	
X_{up}	4,406	3,236	
X_{low}	0,227	0,309	

Quantifizierungsergebnisse von *B. bacteriovorus*

Die Grenzwerte wurden auf die normierten Quantifizierungswerte der Proteine von *B. bacteriovorus* HD100 angewendet. Von den 857 quantifizierten Proteinen konnten 600 mit den Grenzwerten ausgewertet werden. Von den 600 auswertbaren Proteinen konnten bei 389 Proteinen konstante Konzentrationen in allen Proben festgestellt werden, während 211 Proteine reguliert waren. In Tabelle 14 sind die regulierten Proteine aufgelistet. Es wurden wiederum nur Proteine, die in mindestens zwei Replikaten vollständig quantifiziert wurden, berücksichtigt. Eine vollständige Liste aller auswertbaren Proteine ist im Anhang zu finden (Anhang Tab. A2). Zusätzlich konnte erneut ein Protein gefunden werden, welches nicht quantifiziert wurde, aber in mehreren Replikaten nur eine Markierungsart besaß. Auch dieses Protein wurde in die Tabelle aufgenommen. Die Zuweisung der Proteinfunktionen und -lokalisierungen erfolgte erneut über die UniProt^[88]- bzw. die GeneOntology^[128, 129]-Datenbank.

Tab. 14: Regulierte Proteine von *B. bacteriovorus* HD100, bei denen sämtliche Quantifizierungsverhältnisse in mindestens 2 Replikaten quantifiziert wurden. Mithilfe der UniProt^[88]- und der GeneOntology^[128, 129]-Datenbank wurden für jedes Protein die Lokalisierung in der Zelle und die Funktion (jeweils in Englisch) herausgesucht. Die Bezeichnungen Up und Down beschreiben eine Hoch- bzw. Herabregulierung des jeweiligen Proteins. Proteine mit gleicher Regulierung wurden farbig markiert. ¹Bei diesem Protein erfolgte die Zuordnung der Regulierung darüber, dass es nur mit einer Markierungsart identifiziert wurde.

Genlokus	Accession	Beschreibung	Lokalisierung	Funktion (Prozess, <i>Ligand</i>)	Art der Regulierung
Bd0063	Q6MRL4	Uncharacterized protein GN=Bd0063	Membrane	Unknown	APy Up
Bd0112	Q6MRH2	Putative pilus assembly transmembrane protein GN=PilQ	Membrane	Unknown	APy Up
Bd0160	Q6MRC8	Penicillin-binding protein 1A GN=mrcA	Membrane	Transferase activity, transferring glycosyl groups (<i>Nucleic acid binding; Penicillin binding</i>)	APy Up
Bd0408	Q6MQQ2	Flagellin GN=flaA	Secreted, Flagellum	Structural molecule activity	APy Up
Bd0604	Q6MQ77	Flagellin GN=hag	Secreted, Flagellum	Structural molecule activity	APy Up
Bd0674	Q6MQ13	Uncharacterized protein GN=Bd0674	Membrane	Unknown	APy Up
Bd0974	Q6MP89	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase GN=Bd0974	Unknown	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring) activity	APy Up
Bd1111	Q6MNV9	ABC-type antimicrobial peptide transporter, ATPase component GN=Bd1111	Unknown	ATPase activity (<i>ATP binding</i>)	APy Up
Bd1639	Q6MMJ0	Integration host factor subunit alpha GN=ihfA	Unknown	DNA-binding (DNA recombination; Transcription; Transcription regulation; Translation regulation)	APy Up
Bd1661	Q6MMH0	Phosphate import ATP-binding protein PstB GN=pstB	Cytoplasmic membrane	Hydrolase (Phosphate transport; Transport; <i>ATP-binding; Nucleotide-binding</i>)	APy Up
Bd1700	Q6MMD5	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase GN=wbpM	Membrane	Unknown	APy Up
Bd1964	P62033	Probable transcriptional regulatory protein Bd1964 GN=Bd1964	Cytoplasm	(<i>DNA binding</i>)	APy Up
Bd2210	Q6ML13	Uncharacterized protein GN=Bd2210	Membrane	Unknown	APy Up

Bd2233	Q6MKZ3	Protein-export membrane protein SecF GN=secF	Cytoplasmic membrane	(Protein transport; Translocation; Transport)	APy Up
Bd2403	Q6MKI7	Uncharacterized protein GN=Bd2403	Unknown	Unknown	APy Up
Bd2524	Q6MK86	Uncharacterized protein GN=Bd2524	Membrane	(Cyclic-di-GMP binding)	APy Up
Bd2611	Q6MK05	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I GN=fixN	Cytoplasmic membrane	Cytochrome-c oxidase activity (Heme binding; Iron ion binding)	APy Up
Bd2761	Q6MJL4	Putative phosphate regulon protein GN=Bd2761	Cytoplasm	Unknown	APy Up
Bd2801	Q6MJH6	Putative septation protein SpoVG GN=spoVG	Unknown	(Cell cycle; Cell division; Septation)	APy Up
Bd2948	Q6MJ38	Thiol:disulfide interchange protein tlpA GN=resA	Unknown	Antioxidant activity; Oxidoreductase activity	APy Up
Bd3145	Q6MILO	Uncharacterized protein GN=Bd3145	Unknown	Unknown	APy Up
Bd3223	Q6MID8	Sco1/SenC family protein GN=Bd3223	Membrane	Unknown	APy Up
Bd3610	Q6MHD9	Uncharacterized protein GN=Bd3610	Unknown	Unknown	APy Up
Bd3830	Q6MGU1	Uncharacterized protein GN=Bd3830	Membrane	Unknown	APy Up
Bd0032	Q6MRP3	30S ribosomal protein S6 GN=rpsF	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (RNA-binding; rRNA-binding)	APy Down
Bd0099	Q6MRI1	60 kDa chaperonin GN=groL	Cytoplasm	Chaperone (ATP-binding; Nucleotide-binding)	APy Down
Bd0187	Q6MRA5	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit SufC GN=sufC	Unknown	ATPase activity (ATP binding)	APy Down
Bd0240	Q6MR59	Uncharacterized protein GN=Bd0240	Unknown	Carbon-nitrogen ligase activity, with glutamine as amido-N-donor	APy Down
Bd0336	Q6MQW6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GN=slyD	Unknown	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	APy Down
Bd0339	Q6MQW4	RNA-binding protein GN=rbp	Unknown	(Nucleic acid binding)	APy Down
Bd0649	Q6MQ36	Methionine aminopeptidase GN=map	Unknown	Metalloaminopeptidase activity (Metal ion binding)	APy Down
Bd0692	Q6MPZ6	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) GN=gcvP	Unknown	Oxidoreductase (Pyridoxal phosphate)	APy Down
Bd1072	Q6MP00	Uncharacterized protein GN=Bd1072	Unknown	Hydrolase activity	APy Down
Bd1298	Q6MNF8	Chaperone protein DnaK GN=dnaK	Unknown	Chaperone (Stress response; ATP-	APy Down

				<i>binding; Nucleotide-binding)</i>	
Bd1320	Q6MND8	Uncharacterized protein GN=Bd1320	Unknown	Unknown	APy Down
Bd1569	Q6MMQ7	DNA-directed RNA polymerase subunit omega GN=rpoZ	Unknown	Nucleotidyltransferase ; Transferase (Transcription)	APy Down
Bd1598	Q6MMM7	General secretion pathway protein C GN=gspC	Membrane	Unknown	APy Down
Bd1611	Q6MML6	Uncharacterized protein GN=Bd1611	Unknown	Electron carrier activity (<i>Heme binding; Metal ion binding</i>)	APy Down
Bd1624	Q6MMK4	50S ribosomal protein L35 GN=rplM	Ribosome	Structural constituent of ribosome	APy Down
Bd2030	Q6MLI0	Uncharacterized protein GN=Bd2030	Membrane	Unknown	APy Down
Bd2117	Q6ML99	50S ribosomal protein L19 GN=rplS	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein	APy Down
Bd2338	Q6MKP9	Lysine-tRNA ligase GN=lysS	Cytoplasm	Lysine-tRNA ligase activity (<i>Magnesium ion binding; Nucleic acid binding; ATP binding</i>)	APy Down
Bd2478	Q6MKC3	Alanine dehydrogenase GN=alaDH	Unknown	Alanine dehydrogenase activity	APy Down
Bd2491	Q6MKB4	Elongation factor P GN=efp	Cytoplasm	Elongation factor (Protein biosynthesis)	APy Down
Bd2705	Q6MJR4	50S ribosomal protein L25 GN=rplY	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (<i>RNA-binding; rRNA- binding</i>)	APy Down
Bd2951	Q6MJ35	30S ribosomal protein S4 A GN=rpsD1	Small ribosomal subunit	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (<i>RNA-binding; rRNA- binding</i>)	APy Down
Bd2957	Q6MJ30	50S ribosomal protein L30 GN=rpmD	Large ribosomal subunit	Structural constituent of ribosome	APy Down
Bd2958	Q6MJ29	30S ribosomal protein S5 GN=rpsE	Small ribosomal subunit	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (<i>RNA-binding; rRNA- binding</i>)	APy Down
Bd2965	Q6MJ24	50S ribosomal protein L14 GN=rplN	Large ribosomal subunit	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (<i>RNA-binding; rRNA- binding</i>)	APy Down
Bd2967	Q6MJ23	30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (<i>RNA-binding; rRNA- binding</i>)	APy Down
Bd2971	Q6MJ19	50S ribosomal protein L22 GN=rplV	Large ribosomal subunit	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein	APy Down

				(RNA-binding; rRNA-binding)	
Bd2972	Q6MJ18	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	Small ribosomal subunit	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (RNA-binding; rRNA-binding)	APy Down
Bd2976	Q6MJ15	50S ribosomal protein L3 GN=rplC	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (RNA-binding; rRNA-binding)	APy Down
Bd2979	Q6MJ13	Elongation factor G 1 GN=fusA1	Cytoplasm	Elongation factor (Protein biosynthesis; GTP-binding; Nucleotide-binding)	APy Down
Bd2987	Q6MJ06	50S ribosomal protein L7/L12 GN=rplL	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein	APy Down
Bd3059	Q6MIT9	Putative outer membrane protein GN=Bd3059	Unknown	Transporter activity	APy Down
Bd3749	Q6MH16	Lon protease GN=lon	Cytoplasm	Hydrolase; Protease; Serine protease (Stress response; ATP-binding; Nucleotide-binding)	APy Down
Bd3764	Q6MH01	Trigger factor GN=tig	Cytoplasm	Chaperone; Isomerase; Rotamase (Cell cycle; Cell division)	APy Down
Bd3780	Q6MGY6	30S ribosomal protein S2 GN=rpsB	Small ribosomal subunit	Structural constituent of ribosome	APy Down
Bd3782	P61331	Elongation factor Ts GN=tsf	Cytoplasm	Elongation factor (Protein biosynthesis)	APy Down
Bd3849	Q6MGS3	50S ribosomal protein L21 GN=rplU	Ribosome	Ribonucleoprotein; Ribosomal protein (RNA-binding; rRNA-binding)	APy Down
Bd0161	Q6MRC7	Uncharacterized protein GN=Bd0161	Unknown	Unknown	AP Up
Bd1281	Q6MNH4	Uncharacterized protein GN=Bd1281	Unknown	Unknown	AP Up ¹
Bd2095	Q6MLB9	Probable acetyl-CoA acetyltransferase GN=Bd2095	Unknown	Acetyl-CoA C- acetyltransferase activity	AP Up
Bd0833	Q6MPL6	Adventurous gliding motility protein T GN=aglT	Unknown	Unknown	AP Down
Bd1710	Q6MMC6	Uncharacterized protein GN=Bd1710	Unknown	Cysteine synthase activity; Transferase activity	AP Down
Bd2155	Q6ML63	Putative transcriptional regulator GN=Bd2155	Unknown	(DNA binding)	AP Down
Bd2437	Q6MKF7	Phenol 2-monooxygenase GN=Bd2437	Unknown	Phenol 2- monooxygenase activity	AP Down
Bd2726	Q6MJP4	Uncharacterized protein GN=Bd2726	Membrane	Unknown	AP Down

Bd3367	Q6MI13	Conserved sensor histidine kinase GN=Bd3367	Cytoplasm; Membrane	Phosphorelay sensor kinase activity (<i>ATP binding</i>)	AP Down
Bd0888	Q6MPG6	Acriflavin resistance protein GN=acrF	Membrane	Transporter activity	GP2h Up
Bd1340	Q6MNB9	Putative methyl accepting chemotaxis protein GN=Bd1340	Membrane	Signal transducer activity	GP2h Up
Bd1853	Q6MLZ8	Fused isobutyryl-CoA mutase GN=icmF	Unknown	Chaperone; Hydrolase; Isomerase (<i>Cobalamin; Cobalt; GTP-binding; Magnesium; Metal-binding; Nucleotide-binding</i>)	GP2h Up
Bd2751	Q6MJM2	Urocanate hydratase GN=hutU	Cytoplasm	Urocanate hydratase activity	GP2h Up
Bd3070	Q6MIS8	Uncharacterized protein GN=Bd3070	Unknown	Unknown	GP2h Up
Bd3395	Q6MHY9	Flagellar hook protein FlgE GN=flgE	Bacterial flagellum basal body	(Bacterial-type flagellum-dependent cell motility)	GP2h Up
Bd1931	Q6MLS4	Phosphoglucosamine mutase GN=gImM	Unknown	Isomerase (<i>Magnesium; Metal-binding</i>)	GP2h Down
Bd0425	Q6MQN6	Uncharacterized protein GN=Bd0425	Unknown	Unknown	APy, AP Up
Bd0633	Q6MQ51	Peptidoglycan-associated lipoprotein GN=pal	Outer membrane	Unknown	APy, AP Up
Bd0202	Q6MR92	Aminopeptidase P GN=pepP	Unknown	Aminopeptidase activity (<i>Manganese ion binding</i>)	APy, AP Down
Bd1112	Q6MNW8	ABC-type antimicrobial peptide transporter, permease component GN=Bd1112	Cytoplasmic membrane	Unknown	APy, AP Down
Bd1863	Q6MLY9	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase GN=ygcM	Unknown	Lyase activity (<i>Metal ion binding</i>)	APy, AP Down
Bd1904	Q6MLV0	Uncharacterized protein GN=Bd1904	Unknown	Unknown	APy, AP Down
Bd2005	Q6MLK3	Uncharacterized protein GN=Bd2005	Membrane	Unknown	APy, AP Down
Bd2728	Q6MJP2	Oxoglutarate dehydrogenase GN=sucA	Unknown	Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) activity (<i>Thiamine pyrophosphate binding</i>)	APy, AP Down
Bd3092	Q6MIQ9	Methyl-accepting chemotaxis protein GN=Bd3092	Membrane	Signal transducer activity	APy, AP Down
Bd3701	Q6MH57	Uncharacterized protein GN=Bd3701	Unknown	Unknown	APy, AP Down

Bd3900	Q6MGM4	ATP synthase subunit delta GN=atpH	Cytoplasmic membrane	(ATP synthesis; Hydrogen ion transport; Ion transport; Transport)	APy, AP Down
Bd1687	Q6MME7	Uncharacterized protein GN=Bd1687	Membrane	Unknown	GP2h, GP0.5h Up, APy, AP unter- schiedlich
Bd2715	Q6MJQ4	Uncharacterized protein GN=Bd2715	Unknown	Unknown	GP2h, GP0.5h Up, APy, AP unter- schiedlich
Bd2727	Q6MJP3	2,3-bisphosphoglycerate- dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA	Unknown	Isomerase (Gluconeogenesis; Glycolysis)	GP2h, GP0.5h Up, APy, AP unter- schiedlich
Bd3048	Q6MIV0	Chaperone protein ClpB GN=clpB	Cytoplasm	Chaperone (Stress response; <i>ATP- binding; Nucleotide- binding</i>)	GP2h, GP0.5h Up, APy, AP unter- schiedlich
Bd3178	Q6MIH9	Aconitate hydratase GN=acnA	Unknown	Lyase (4Fe-4S; Iron; <i>Iron-sulfur; Metal- binding</i>)	GP2h, GP0.5h Up, APy, AP unter- schiedlich
Bd2054	Q6MLF7	Uncharacterized protein GN=Bd2054	Unknown	Unknown	APy, GP2h Up
Bd0796	Q6MPQ2	Enolase GN=eno	Cytoplasm; Secreted; Cell surface	Lyase (Glycolysis; <i>Magnesium; Metal- binding</i>)	Andere Regulierung
Bd3061	Q6MIT7	Uncharacterized protein GN=Bd3061	Membrane	Unknown	Andere Regulierung

Trotz einer geringeren Gesamtzahl an Replikaten konnten bei den neuen Proben deutlich mehr Proteine in mehreren Replikaten quantifiziert werden und diese sind deshalb hier aufgelistet, was wohl v. a. auf die verbesserte Auftrennung mittels SCX zurückzuführen ist. Auch beim zweiten Probensatz sind für die meisten regulierten Proteine weder die Lokalisierung in der Zelle noch die Funktion bekannt. Die größten Unterschiede in den Proteinmengen gibt es zwischen APy und AP. So sind 61 der 96 regulierten Proteine in APy reguliert. Es sind unter anderem zwei Flagellin-Proteine (Bd0408, Bd0604) und das *Putative pilus assembly transmembrane protein* (Bd0112) hochreguliert in APy. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das Flagellum und die Pili in APy gerade gebildet werden. In APy ist weiterhin auch das mit der Zellteilung in Zusammenhang stehende *Putative septation protein SpoVG*

(Bd2801) hochreguliert. Eventuell könnte es sich hierbei um noch nicht abgebaute Reste handeln, da bei jungen AP-Zellen die Zellteilung gerade erst abgeschlossen wurde. In APy sind 16 ribosomale Proteine herabreguliert. Darüber hinaus sind auch noch drei Elongationsfaktoren (Bd2979, Bd3782, Bd2491) und zwei weitere RNA- bzw. DNA-bindende Proteine (Bd0339, Bd1569) herabreguliert. Dies könnte dafür sprechen, dass die Bildung der Ribosomen in jungen AP-Zellen noch nicht vollständig abgeschlossen ist und dass damit verbunden die Translation eventuell eingeschränkt ist. Alle diese Beobachtungen bestätigen die auf genetischer Ebene gemachte Beobachtung, dass sich APy und AP unterscheiden, auch auf Proteinebene.

Bei GP0.5h ist auffällig, dass keines der regulierten Proteine ausschließlich 30 min nach der Penetration reguliert ist. Proteine, die in dieser Phase reguliert sind, sind in der Regel auch 2 h nach der Penetration reguliert. Die einzige Ausnahme hierbei ist das uncharakterisierte Protein Bd2054, bei welchem die Proteinexpression 30 min nach der Penetration eher der AP und nicht der Phase 2 h nach der Penetration gleicht. Folglich scheint es kaum Unterschiede im Proteinmuster von GP0.5h und GP2h zu geben. Die Beobachtung, dass es innerhalb der GP kaum Unterschiede im Proteinmuster gibt, wurde auch schon beim ersten Probensatz gemacht (Vgl. Kapitel 3.5). Überraschend ist allerdings, dass dies auch schon 30 min nach der Penetration der Fall ist. Dies spricht dafür, dass *B. bacteriovorus* den Wechsel zwischen AP und GP mit der zugehörigen Änderung im Proteinmuster direkt nach der Penetration sehr schnell und eher schlagartig vollzieht.

Quantifizierungsergebnisse von *E. coli*

Auch für den neuen Probensatz wurde die Proteinregulierung vom Wirt *E. coli* K-12 untersucht. Von den 1288 quantifizierten Proteinen waren 1031 auswertbar. Die Omp-Normierungsproteine lieferten beim neuen Probensatz deutlich sinnvollere Ergebnisse. So wurden mit dieser Normierung nur 6 Proteine hochreguliert, während 122 Proteine konstant waren. 151 Proteine waren 30 min nach der Penetration im Vergleich zur reinen *E. coli* K-12 Probe herabreguliert. 131 Proteine waren sowohl 30 min nach der Penetration als auch 2 h nach der Penetration noch weiter herabreguliert. Die restlichen 613 Proteine waren in GP2h herabreguliert. Da die Normierungsproteine hier sinnvolle Ergebnisse lieferten, könnten diese eventuell doch nicht das Problem bei der Quantifizierung von *E. coli* im ersten

Probensatz (Vgl. Kapitel 3.5) sein. Eventuell sind im ersten Probensatz 1 h nach der Penetration die meisten identifizierten Proteine bereits abgebaut, sodass nur noch ein geringer Rest übrig bleibt. Dadurch gäbe es kaum noch Unterschiede zwischen GP1h, GP2h und GP3h, wodurch sich die große Zahl an konstanten Proteinen erklären ließe. Andererseits lässt sich dadurch nicht die große Zahl an hochregulierten Proteinen im ersten Probensatz erklären. Daher wurde auch der zweite Probensatz für *E. coli* eher qualitativ interpretiert. Folglich wurden nur jene Proteine betrachtet, die sowohl 30 min als auch 2 h nach der Penetration herabreguliert sind, da hier eventuell ein schnellerer Abbau angenommen werden kann. In Tabelle 15 diese Proteine aufgelistet, wobei wiederum nur Proteine berücksichtigt wurden, die in mehreren Replikaten quantifiziert wurden.

Tab. 15: Auflistung der Proteine von *E. coli* K-12, die vermutlich am stärksten bzw. am schnellsten abgebaut werden. Mithilfe der UniProt^[88]- und der GeneOntology^[128, 129]-Datenbank wurden für alle Proteine die Lokalisierung in der Zelle (in Englisch) aufgelistet.

Genlokus	Accession	Beschreibung	Lokalisierung
b3908 JW3879	P00448	Superoxide dismutase [Mn] GN=sodA	Cytosol
b3067 JW3039	P00579	RNA polymerase sigma factor RpoD GN=rpoD	Cytosol
b1613 JW1605	P00946	Mannose-6-phosphate isomerase GN=manA	Cytosol
b3559 JW3530	P00961	Glycine-tRNA ligase beta subunit GN=glyS	Cytosol
b2400 JW2395	P04805	Glutamate-tRNA ligase GN=gltX	Cytosol
b1923 JW1908	P04949	Flagellin GN=fliC	Extracellular region
b3772 JW3745	P04968	L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA GN=ilvA	Unknown
b2320 JW2317	P05459	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase GN=pdxB	Cytosol
b3671 JW3646	P08142	Acetolactate synthase isozyme 1 large subunit GN=ilvB	Acetolactate synthase complex
b2416 JW2409	P08839	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase GN=ptsI	Cytosol
b4014 JW3974	P08997	Malate synthase A GN=aceB	Cytoplasm
b2296 JW2293	P0A6A3	Acetate kinase GN=ackA	Cytosol
b2530 JW2514	P0A6B7	Cysteine desulfurase IscS GN=iscS	Cytosol
b3172 JW3140	P0A6E4	Argininosuccinate synthase GN=argG	Cytosol
b0438 JW0428	P0A6H1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX GN=clpX	Cytosol
b4383 JW4346	P0A6K6	Phosphopentomutase GN=deoB	Cytosol
b0170 JW0165	P0A6P1	Elongation factor Ts GN=tsf	Cytosol
b0954 JW0937	P0A6Q3	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase GN=fabA	Cytosol

b1091 JW1077	POA6R0	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3 GN=fabH	Cytosol
b1778 JW1767	POA746	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB GN=msrB	Cytosol
b0172 JW0167	POA805	Ribosome-recycling factor GN=frr	Cytosol
b2464 JW2448	POA867	Transaldolase A GN=talA	Cytosol
b1864 JW1853	POA8A0	Probable transcriptional regulatory protein YebC GN=yebC	Cytosol
b4406 JW0185	POA8K5	UPF0253 protein YaeP GN=yaeP	Unknown
b2323 JW2320	POA953	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 1 GN=fabB	Cytosol
b1767 JW1756	POA962	L-asparaginase 1 GN=ansA	Cytosol
b4015 JW3975	POA9G6	Isocitrate lyase GN=aceA	Cytosol
b2599 JW2580	POA9J8	P-protein GN=pheA	Cytoplasm
b4401 JW4364	POA9Q1	Aerobic respiration control protein ArcA GN=arcA	Cytosol
b4391 JW4354	POA9W3	Energy-dependent translational throttle protein EttA GN=ettA	Cytoplasm
b3279 JW5710	POA9W9	Protein YrdA GN=yrdA	Cytosol
b3251 JW3220	POA9X4	Rod shape-determining protein MreB GN=mreB	Cytoplasmic membrane
b1092 JW1078	POAAI9	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase GN=fabD	Cytosol
b2925 JW2892	POAB71	Fructose-bisphosphate aldolase class 2 GN=fbaA	Cytosol
b0435 JW5060	POABE2	DNA-binding transcriptional regulator BolA GN=bolA	Cytosol
b2143 JW2131	POABF6	Cytidine deaminase GN=cdd	Cytosol
b0882 JW0866	POABH9	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA GN=clpA	Cytosol
b1203 JW1194	POABU2	Ribosome-binding ATPase YchF GN=ychF	Cytoplasm
b1654 JW1646	POAC69	Glutaredoxin 4 GN=grxD	Cytosol
b1651 JW1643	POAC81	Lactoylglutathione lyase GN=gloA	Cytosol
b2529 JW2513	POACD4	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU GN=iscU	Cytosol
b1237 JW1225	POACF8	DNA-binding protein H-NS GN=hns	Cytosol
b2343 JW2340	POAD33	UPF0381 protein YfcZ GN=yfcZ	Cytosol
b1739 JW1728	POADB1	Osmotically-inducible putative lipoprotein OsmE GN=osmE	Cytoplasmic membrane
b3670 JW3645	POADF8	Acetolactate synthase isozyme 1 small subunit GN=ilvN	Cytosol
b2672 JW2647	POADQ7	Uncharacterized protein YgaM GN=ygaM	Cytosol
b3192 JW3159	POADV7	Probable phospholipid-binding protein MlaC GN=mlaC	Periplasm
b3318 JW3280	POADZ0	50S ribosomal protein L23 GN=rplW	Cytosol
b0605 JW0598	POAE08	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C GN=ahpC	Cytosol
b2480 JW2465	POAE52	Putative peroxiredoxin bcp GN=bcp	Cytosol
b2150 JW2137	POAEE5	D-galactose-binding periplasmic protein GN=mgIB	Periplasm

b2266 JW2261	P0AEH5	Protein ElaB GN=elaB	Cytosol
b1920 JW1905	P0AEM9	L-cystine-binding protein FliY GN=fliY	Periplasm
b1236 JW1224	P0AEP3	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase GN=galU	Cytosol
b3510 JW3478	P0AES9	Acid stress chaperone HdeA GN=hdeA	Periplasm
b3509 JW5669	P0AET2	Acid stress chaperone HdeB GN=hdeB	Periplasm
b4034 JW3994	P0AEX9	Maltose-binding periplasmic protein GN=malE	Periplasm
b0159 JW0155	P0AF12	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase GN=mtnN	Cytosol
b4108 JW4069	P0AFJ1	Protein PhnA GN=phnA	Cytosol
b2344 JW2341	P10384	Long-chain fatty acid transport protein GN=fadL	Membrane
b3960 JW3932	P11447	Argininosuccinate lyase GN=argH	Cytoplasm
b1764 JW1753	P16456	Selenide, water dikinase GN=selD	Cytosol
b1258 JW1250	P21362	Protein YciF GN=yciF	Unknown
b1623 JW1615	P22333	Adenosine deaminase GN=add	Cytosol
b1243 JW1235	P23843	Periplasmic oligopeptide-binding protein GN=oppA	Periplasm
b0525 JW0514	P23869	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B GN=ppiB	Cytosol
b0154 JW0150	P23893	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase GN=hemL	Cytosol
b1276 JW1268	P25516	Aconitate hydratase A GN=acnA	Cytosol
b2661 JW2636	P25526	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD GN=gabD	Cytoplasm
b4069 JW4030	P27550	Acetyl-coenzyme A synthetase GN=acs	Cytosol
b1190 JW1179	P29012	Alanine racemase, catabolic GN=dadX	Unknown
b4022 JW3982	P32684	23S rRNA pseudouridine(2604) synthase GN=rluF	Cytosol
b2009 JW1991	P33012	DNA gyrase inhibitor GN=sbmC	Cytoplasm
b2137 JW2125	P33368	Uncharacterized oxidoreductase YohF GN=yohF	Unknown
b0763 JW0746	P37329	Molybdate-binding periplasmic protein GN=modA	Periplasm
b3588 JW3561	P37685	Aldehyde dehydrogenase B GN=aldB	Unknown
b0655 JW5092	P37902	Glutamate/aspartate import solute-binding protein GN=gluI	Periplasm
b4227 JW4186	P39325	ABC transporter periplasmic-binding protein YtfQ GN=ytfQ	Periplasm
b2687 JW2662	P45578	S-ribosylhomocysteine lyase GN=luxS	Cytosol
b2937 JW2904	P60651	Agmatinase GN=speB	Cytosol
b2515 JW2499	P62620	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin) GN=ispG	Cytosol
b1431 JW1427	P64451	Uncharacterized lipoprotein YdcL GN=ydcL	Cytoplasmic membrane
b1480 JW5962	P68191	Stationary-phase-induced ribosome-associated protein GN=sra	Cytosol

b2094 JW2078/ JW2081	P69828	PTS system galactitol-specific EIIA component GN=gatA	Cytosol
b0325 JW0317	P75691	Aldehyde reductase YahK GN=yahK	Unknown
b0865 JW0849	P75818	Uncharacterized lipoprotein YbjP GN=ybjP	Cytoplasmic membrane
b1423 JW1419	P76097	Uncharacterized protein YdcJ GN=ydcJ	Unknown
b1516 JW1509	P76142	Autoinducer 2-binding protein LsrB GN=lsrB	Periplasm
b1498 JW5243	P77318	Uncharacterized sulfatase YdeN GN=ydeN	Periplasm
b1640 JW1632	P77570	Anhydro-N-acetylmuramic acid kinase GN=anmK	Unknown
b1748 JW1737	P77581	Succinylornithine transaminase GN=astC	Unknown
b0419 JW0409	P77735	Uncharacterized oxidoreductase YajO GN=yajO	Cytosol

Viele Ergebnisse, die beim ersten Probensatz erhalten wurden, konnten auch im neuen Probensatz repliziert und damit bestätigt werden. 15 der 92 vermutlich schneller abgebauten Proteine weisen eine ATP-wechselwirkende Funktion auf. Sieben der ATP-wechselwirkenden Proteine sind Enzyme, die ATP als Cofaktor benutzen. Weitere fünf der Proteine sind ATPasen und stehen damit direkt in Verbindung mit dem Energiehaushalt. Folglich kann auch hier die Vermutung aufgestellt werden, dass Proteine, die mit ATP in Verbindung stehen, von *B. bacteriovorus* bevorzugt abgebaut werden.

Auch bei den neuen Proben sind der größte Teil der vermutlich schneller abgebauten Proteine im Zytoplasma lokalisiert, wobei hier insbesondere die gelösten Proteine des Zytosols bevorzugt werden. Weiterhin scheinen auch 12 periplasmatische Proteine schneller abgebaut zu werden, während dies nur auf ein extrazelluläres Protein und ein Protein der äußeren Membran zutrifft. Somit kann auch bei den neuen *B. bacteriovorus* Proben bestätigt werden, dass für einen schnelleren Abbau durch *B. bacteriovorus* vor allem die Lokalisierung und damit verbunden die Zugänglichkeit von Bedeutung sind, während die Funktionalität des abgebauten Proteins eher eine untergeordnete Rolle spielt.

3.7 Vergleich der regulierten Proteine in beiden Probensätzen

Um eine noch umfangreichere Aussage bezüglich der Proteinregulierung im Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* treffen zu können, sollten die Ergebnisse der beiden Probensätze verglichen werden. Der erste Probensatz enthielt, neben AP Zellen, Zellen 1 h, 2 h und 3 h nach der Wirtspenetration. Der zweite Satz Proben enthielt ebenfalls AP-Zellen und Zellen 2 h nach der

Penetration und darüber hinaus junge AP-Zellen und aufgrund der verbesserten Synchronisierung Zellen 30 min nach der Penetration. Da beide Probensätze eine AP-Probe und eine GP-Probe 2 h nach der Penetration enthielten, wurde über den Vergleich beider Proben auch die Konsistenz beider Probensätze untersucht.

Insgesamt, d. h. ohne Berücksichtigung der Anzahl an Replikaten, in denen ein Protein quantifiziert wurde, hatten beide Probensätze 378 Proteine von *B. bacteriovorus* HD100, die jeweils mit den berechneten Grenzwerten auswertbar waren, gemein. Bei 302 dieser Proteine gab es, basierend auf dem Vergleich der AP-Probe mit der Probe 2 h nach der Penetration, eine Übereinstimmung im Regulierungsmuster beider Probensätze. Bei den restlichen 76 Proteinen gab es Widersprüche. Bei 68 dieser widersprüchlichen Proteine war die AP-Probe zur GP2h-Probe in einem Probensatz konstant, während sie im anderen Probensatz in irgendeiner Form reguliert war. Dies konnte insbesondere dann auftreten, wenn die Quantifizierungsverhältnisse bei beiden Probensätzen nah an den Grenzwerten für die Regulierung lagen, sodass sie im einen Probensatz als reguliert und im anderen Probensatz als konstant zugewiesen wurden. Wirklich stark widersprüchlich, d. h., dass beispielsweise die AP-Probe im einen Probensatz hoch- und im anderen Probensatz herabreguliert war, waren nur 8 der Proteine. Bei ausschließlicher Berücksichtigung jener Proteine, die in mehreren Replikaten quantifiziert wurden, verringert sich die Anzahl der Proteine, die in beiden Probensätzen quantifiziert wurden, deutlich. In Tabelle 16 sind jene Proteine von *B. bacteriovorus* HD100 gegenübergestellt, die in einem der beiden Probensätze reguliert wurden. Dabei wurden nur Proteine berücksichtigt, die in beiden Probensätzen in mehreren Replikaten quantifiziert wurden. Die zugehörigen Lokalisierungen und Funktionen der Proteine können den Tabellen 10 (Kapitel 3.5) und 14 (Kapitel 3.6) entnommen werden.

Tab. 16: Vergleich der Proteinregulierung in beiden Probensätzen. Es wurden nur regulierte Proteine berücksichtigt, die in beiden Probensätzen in mehreren Replikaten quantifiziert wurden. Die Probensätze wurden bezüglich der Proteinregulierung zwischen AP und GP2h verglichen. Die Probenbezeichnungen entsprechen den Probenbezeichnungen in Kapitel 3.5 und 3.6. Die Proteinbeschreibung wurde aus der UniProt^[88]-Datenbank entnommen und ist daher auf Englisch.

Genlokus	Accession	Beschreibung	Proteinmuster im 1. Probensatz	Proteinmuster im 2. Probensatz	Vergleich Probensätze (AP zu GP2h)
Bd0022	Q6MRQ2	Electron transfer flavoprotein beta-subunit GN=etfB	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd0032	Q6MRP3	30S ribosomal protein S6 GN=rpsF	Konstant	APy herabreguliert	Konsistent
Bd0063	Q6MRL4	Uncharacterized protein GN=Bd0063	AP und GP1h hochreguliert	APy hochreguliert	Schwacher Widerspruch
Bd0099	Q6MRI1	60 kDa chaperonin GN=groL	Konstant	APy herabreguliert	Konsistent
Bd0112	Q6MRH2	Putative pilus assembly transmembrane protein GN=PilQ	AP und GP1h hochreguliert	APy hochreguliert	Schwacher Widerspruch
Bd0240	Q6MR59	Uncharacterized protein GN=Bd0240	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd0336	Q6MQW6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GN=slyD	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd0427	Q6MQN4	Uncharacterized protein GN=Bd0427	AP hochreguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd0459	Q6MQK7	Uncharacterized protein GN=Bd0459	AP und GP1h hochreguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd0585	Q6MQ94	D-alanine–D-alanine ligase GN=ddl	GP3h hochreguliert	Konstant	Konsistent
Bd0586	Q6MQ93	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2 GN=elb	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd0633	Q6MQ51	Peptidoglycan-associated lipoprotein GN=pal	Konstant	APy und AP hochreguliert	Schwacher Widerspruch
Bd0674	Q6MQ13	Uncharacterized protein GN=Bd0674	Konstant	APy hochreguliert	Konsistent
Bd0796	Q6MPQ2	Enolase GN=Eno	Konstant	Kontinuierlicher Anstieg von APy zu GP2h	Schwacher Widerspruch
Bd0974	Q6MP89	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase GN=Bd0974	GP1h hochreguliert	APy hochreguliert	Konsistent
Bd1054	Q6MP15	Asparagine–tRNA ligase GN=asnS	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd1298	Q6MNF8	Chaperone protein DnaK GN=dnaK	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd1320	Q6MND8	Uncharacterized protein GN=Bd1320	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd1467	Q6MMZ9	30S ribosomal protein S20 GN=rpsT	GP3h herab-reguliert	Konstant	Konsistent
Bd1509	Q6MMW4	Type IV pilus biogenesis protein PilB GN=pilB	GP1h hochreguliert	Konstant	Konsistent
Bd1606	Q6MMM1	Probable cytochrome C-type biogenesis protein GN=Bd1606	GP1h hochreguliert	Konstant	Konsistent

Bd1608	Q6MML9	Molybdopterin oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit GN=hmoA	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd1611	Q6MML6	Uncharacterized protein GN=Bd1611	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd1639	Q6MMJ0	Integration host factor subunit alpha GN=ihfA	Konstant	APy hochreguliert	Konsistent
Bd1661	Q6MMH0	Phosphate import ATP-binding protein PstB GN=pstB	Konstant	APy hochreguliert	Konsistent
Bd1835	Q6MM13	Acetyl-CoA acyltransferase GN=Bd1835	GP2h herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd1904	Q6MLV0	Uncharacterized protein GN=Bd1904	Konstant	APy und AP herabreguliert	Schwacher Widerspruch
Bd1931	Q6MLS4	Phosphoglucosamine mutase GN=glmM	Konstant	GP2h herab-reguliert	Schwacher Widerspruch
Bd2001	Q6MLK7	YCE I like family protein GN=Bd2001	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd2005	Q6MLK3	Uncharacterized protein GN=Bd2005	AP herab-reguliert	APy und AP herab-reguliert	Konsistent
Bd2030	Q6MLI0	Uncharacterized protein GN=Bd2030	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2095	Q6MLB9	Probable acetyl-CoA acetyltransferase GN=Bd2095	Konstant	AP hochreguliert	Schwacher Widerspruch
Bd2117	Q6ML99	50S ribosomal protein L19 GN=rplS	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2212	Q6ML11	Uncharacterized protein GN=Bd2212	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd2233	Q6MKZ3	Protein-export membrane protein SecF GN=secF	Konstant	APy hochreguliert	Konsistent
Bd2338	Q6MKP9	Lysine-tRNA ligase GN=lysS	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2478	Q6MKC3	Alanine dehydrogenase GN=alaDH	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2491	Q6MKB4	Elongation factor P GN=efp	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2675	Q6MJU3	Putative membrane protein with protease subunit GN=Bd2675	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd2705	Q6MJR4	50S ribosomal protein L25 GN=rplY	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2707	Q6MJR2	Ribosome-binding ATPase YchF GN=yhfF	GP3h hochreguliert	Konstant	Konsistent
Bd2726	Q6MJP4	Uncharacterized protein GN=Bd2726	AP und GP1h hochreguliert	AP herab-reguliert	Starker Widerspruch
Bd2727	Q6MJP3	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA	AP herab-reguliert	APy herab-reguliert, GP0.5h und GP2h hochreguliert	Konsistent
Bd2728	Q6MJP2	Oxoglutarate dehydrogenase GN=sucA	Konstant	APy und AP herabreguliert	Schwacher Widerspruch
Bd2751	Q6MJM2	Urocanate hydratase GN=hutU	AP herab-reguliert	GP2h hochreguliert	Konsistent

Bd2801	Q6MJH6	Putative septation protein SpoVG GN=spoVG	Konstant	APy hochreguliert	Konsistent
Bd2950	Q6MJ36	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha GN=rpoA	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd2951	Q6MJ35	30S ribosomal protein S4 A GN=rpsD1	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2957	Q6MJ30	50S ribosomal protein L30 GN=rpmD	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2958	Q6MJ29	30S ribosomal protein S5 GN=rpsE	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2965	Q6MJ24	50S ribosomal protein L14 GN=rplN	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2967	Q6MJ23	30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2971	Q6MJ19	50S ribosomal protein L22 GN=rplV	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2972	Q6MJ18	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	AP herab-reguliert	APy herab-reguliert	Schwacher Widerspruch
Bd2976	Q6MJ15	50S ribosomal protein L3 GN=rplC	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd2987	Q6MJ06	50S ribosomal protein L7/L12 GN=rplL	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd3048	Q6MIV0	Chaperone protein ClpB GN=clpB	AP herab-reguliert	APy herab-reguliert, GP0.5h und GP2h hochreguliert	Konsistent
Bd3052	Q6MIU6	Flagellin GN=flgL	GP3h hochreguliert	Konstant	Konsistent
Bd3058	Q6MIU0	Efflux transporter GN=noIG	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd3081	Q6MIR8	NADH dehydrogenase I chain G GN=nuoG	AP und GP1h hochreguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd3178	Q6MIH9	Aconitate hydratase GN=acnA	AP herab-reguliert	APy herab-reguliert, GP0.5h und GP2h hochreguliert	Konsistent
Bd3311	Q6MI59	Aspartate-tRNA(Asp/Asn) ligase GN=aspS	AP und GP1h hochreguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd3424	Q6MHW0	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] GN=gImS	AP herab-reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd3610	Q6MHD9	Uncharacterized protein GN=Bd3610	Konstant	APy hochreguliert	Konsistent
Bd3749	Q6MH16	Lon protease GN=lon	AP herab-reguliert	APy herab-reguliert	Schwacher Widerspruch
Bd3764	Q6MH01	Trigger factor GN=tig	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd3780	Q6MGY6	30S ribosomal protein S2 GN=rpsB	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd3782	P61331	Elongation factor Ts GN=tsf	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent
Bd3849	Q6MGS3	50S ribosomal protein L21 GN=rplU	Konstant	APy herab-reguliert	Konsistent

Bd3861	Q6MGR3	Pyruvate carboxylase GN=Bd3861	AP herab- reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch
Bd3897	Q6MGM7	ATP synthase subunit beta GN=atpD	AP herab- reguliert	Konstant	Schwacher Widerspruch

Zwei Drittel der regulierten Proteine liefern bei beiden Probensätzen konsistente Ergebnisse. Bei den nicht-konsistenten Ergebnissen ergeben sich die schwachen Widersprüche meist daraus, dass die AP-Probe in einem der Probensätze reguliert und im Anderen konstant ist. Die Ausnahme bildet dabei das uncharakterisierte Protein mit dem Genlokus Bd2726. Dieses Protein ist der einzige starke Widerspruch zwischen beiden Probensätzen, da AP im ersten Probensatz als hochreguliert und im zweiten Probensatz als herabreguliert identifiziert wurde.

Die Proteine mit konsistenten Ergebnissen sind häufig in einem der Probensätze reguliert und im anderen Probensatz konstant. Folglich sind viele der Proteine nur in einer Phase des Lebenszyklus hoch- oder herabreguliert. Hierbei sind insbesondere die ribosomalen Proteine auffällig, wovon viele ausschließlich bei jungen AP-Zellen herabreguliert sind. Dies unterstreicht wiederum die Vermutung, dass es sich bei jungen AP-Zellen um eine eigene Phase des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* handelt und dass die Ribosomen dieser Zellen eventuell noch nicht vollständig ausgebildet sind. Das uncharakterisierte Protein mit dem Genlokus Bd2005 scheint ein GP-spezifisches Protein zu sein, da es in beiden Probensätzen in AP und im zweiten Probensatz auch in APy herabreguliert ist. Die Urocanat Hydratase (Bd2751) scheint erst in der späteren GP eine Rolle zu spielen, da das Protein in APy, AP und 30 min nach der Penetration herabreguliert ist. Dies ist nachvollziehbar, da Bd2751 am Histidinabbau beteiligt ist und somit erst bei der Zersetzung der *E. coli* Proteine in großen Mengen benötigt wird. Weitere Beispiele für GP-spezifische Proteine sind die 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglyceratmutase (Bd2727), das Chaperonprotein ClpB (Bd3048) und die Aconitat-Hydratase (Bd3178), wobei bei diesen Proteinen APy noch weiter herabreguliert ist als AP.

Durch eine Kombination der Ergebnisse beider Probensätze kann für die Proteine, die in beiden Probensätzen konsistent waren, die Regulierung zu den sechs verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus grafisch aufgetragen werden. Auf diese Weise lässt sich ein relatives Proteinprofil über annähernd dem gesamten Lebenszyklus für das jeweilige Protein

darstellen. In Abbildung 22 ist dies beispielhaft für vier regulierte Proteine gemacht worden. Es wurde jeweils auf die Probe mit dem kleinsten Verhältnis normiert.

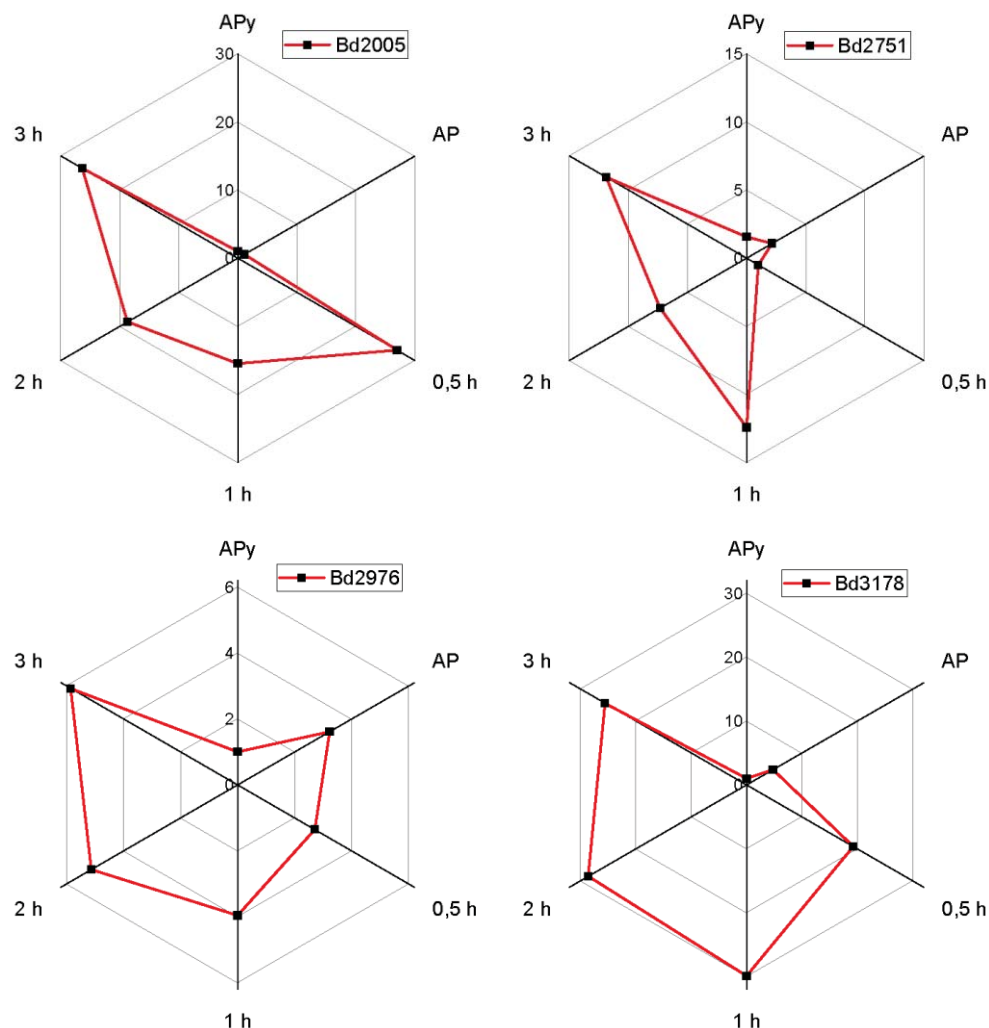


Abb. 22: Relative Proteinprofile für vier ausgewählte regulierte Proteine. Bei den Proteinen Bd2005, Bd2976 und Bd3178 wurde jeweils auf APy normiert, bei Bd2751 wurde auf 0,5 h normiert. Die Stundenzahlen entsprechen der Zeit nach der Wirtspenetration der jeweiligen Probe.

Die Proteinprofile spiegeln gut die über die Grenzwerte bestimmten Regulierungen wider. So ist Bd2005 in APy und AP, Bd2751 in APy, AP und GP0.5h und Bd2976 in APy herabreguliert. Auf den ersten Blick nicht so gut erkennbar ist die Regulierung bei Bd3178. Dadurch, dass das Protein in den vier GP-Proben in sehr großen Überschüssen (bis zu Faktor 30) vorliegt, wirkt der Unterschied zwischen APy und AP eher klein. Bei ausschließlicher Betrachtung von APy und AP fällt allerdings auf, dass das Protein in AP im fünffachen Überschuss zu APy vorliegt und dementsprechend auch hier reguliert ist.

3.8 Entwicklung eines neuen MeCAT-Reagenzes

Im Zusammenhang mit der Proteinquantifizierung von *B. bacteriovorus* wurde auch die MeCAT-Quantifizierungsstrategie weiterentwickelt. Daher sollen diese Ergebnisse hier vorgestellt werden. In Vorversuchen zur MeCAT-Markierung von *B. bacteriovorus* (Vgl. Kapitel 3.4) konnten jene 70 % der cysteinhaltigen Peptide, die markiert waren, nicht in unmarkierter Form gefunden werden. Folglich kann darauf geschlossen werden, dass die Markierung, wenn sie abläuft, vollständig abläuft. Die 30 % der nicht mit MeCAT markierten, cysteinhaltigen Peptide, die identifiziert wurden, scheinen sich prinzipiell nicht mit dem Reagenz markieren zu lassen. Eine mögliche Erklärung dafür könnten sterische Hinderungen sein. Aufgrund des Thiols bzw. des Thiolates im Basischen als Nukleophil und des Iodsubstituenten als Fluchtgruppe verläuft die Markierungsreaktion vermutlich vorrangig über den S_N2 -Mechanismus^[130]. Und da beim S_N2 -Mechanismus die Substitution über einen Rückseitenangriff erfolgt, könnte dies zu sterischen Hinderungen zwischen dem relativ großen DOTA-Komplex und dem Protein führen. In Abbildung 23 ist diese potentielle sterische Hinderung schematisch veranschaulicht.

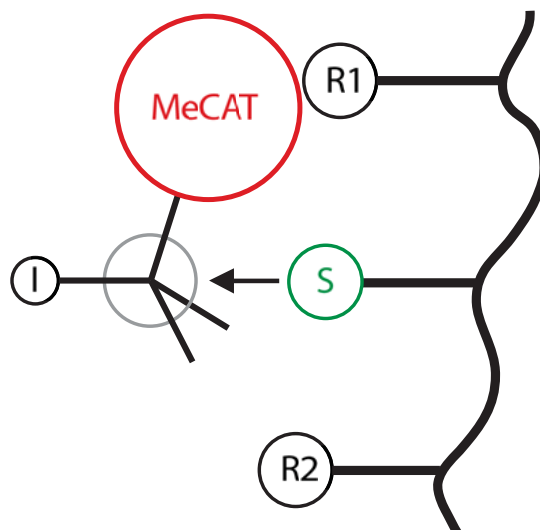


Abb. 23: Schematische Darstellung der potentiellen sterischen Hinderung der Markierungsreaktion durch den S_N2 -Mechanismus. Aufgrund des Rückseitenangriffs stehen die MeCAT-Gruppe und das Protein auf derselben Seite, was abhängig von der Struktur des Proteins zu sterischen Hinderungen führen könnte.

Ein weiterer Hinweis auf eine potentielle sterische Hinderung ist, dass bei den Vorversuchen von den 30 % nicht mit MeCAT markierten Peptiden nur die Hälfte unmarkiert war. Bei der anderen Hälfte waren die Cysteinreste mit Propionamid markiert. Diese Nebenreaktion tritt

häufig bei der SDS-PAGE auf, wenn die Cysteinreste nicht mit Iodacetamid geschützt sind. Die Thiofunktion reagiert dabei über eine Additionsreaktion mit dem Acrylamid. Da für die Additionsreaktion kein Rückseitenangriff notwendig ist, ist diese Reaktion deutlich weniger anfällig für potentielle sterische Hinderungen. Aus diesem Grund und da diese Reaktion bereits als Nebenreaktion abläuft, wurde entschieden, eine neue MeCAT-Markierungsstrategie mit Acrylamidfunktionalität zu entwickeln, um so potentielle sterische Hinderungen zu umgehen.

Reagenzsynthese und Markierungsexperimente

In Testansätzen, bei denen verschiedene Überschüsse von Acrylamid unter basischen Bedingungen zu Cystein gegeben wurden, konnte eine quantitative Markierung des Cysteins mit Acrylamid erreicht werden. Aus diesem Grund wurde ein MeCAT-Reagenz mit Acrylamidfunktionalität synthetisiert. Die Synthese wurde in Analogie zur Synthese des Iodacetamidreagenzes durchgeführt^[131]. Da allerdings im Gegensatz zu MeCAT-IA die Zwischenstufe des NHS-Esters kommerziell zu einem relativ günstigen Preis erhältlich ist, musste dieser nicht synthetisiert werden. In Abbildung 24 ist das Reaktionsschema für die Synthese dargestellt. Bei der Aufreinigung des Reagenzes mittels HPLC konnten die bereits von den Maleinimid- und Iodacetamidreagenzien bekannten Diastereomere beobachtet werden^[113, 119].

In Zusammenarbeit mit VÖLZKE wurden im Anschluss an die Synthese diverse Untersuchungen bezüglich des Protein- und Peptidmarkierungsverhaltens des neuen Reagenzes durchgeführt^[132]. Dabei konnten zwar prinzipiell Markierungen am Modellprotein α -Lactalbumin beobachtet werden, jedoch waren diese nicht vollständig. Dies lag vermutlich an geringeren Reaktivitäten der Acrylamidfunktionalität im Vergleich zur Iodacetamidfunktionalität. Da mit dem neuen Reagenz keine Verbesserung der Markierungsausbeuten im Vergleich zum Iodacetamidreagenz erreicht werden konnten, ist eine Anwendung des Reagenzes zur Proteinquantifizierung nicht sinnvoll. Allerdings gibt es ein anderes potentielles Anwendungsgebiet für das Reagenz.

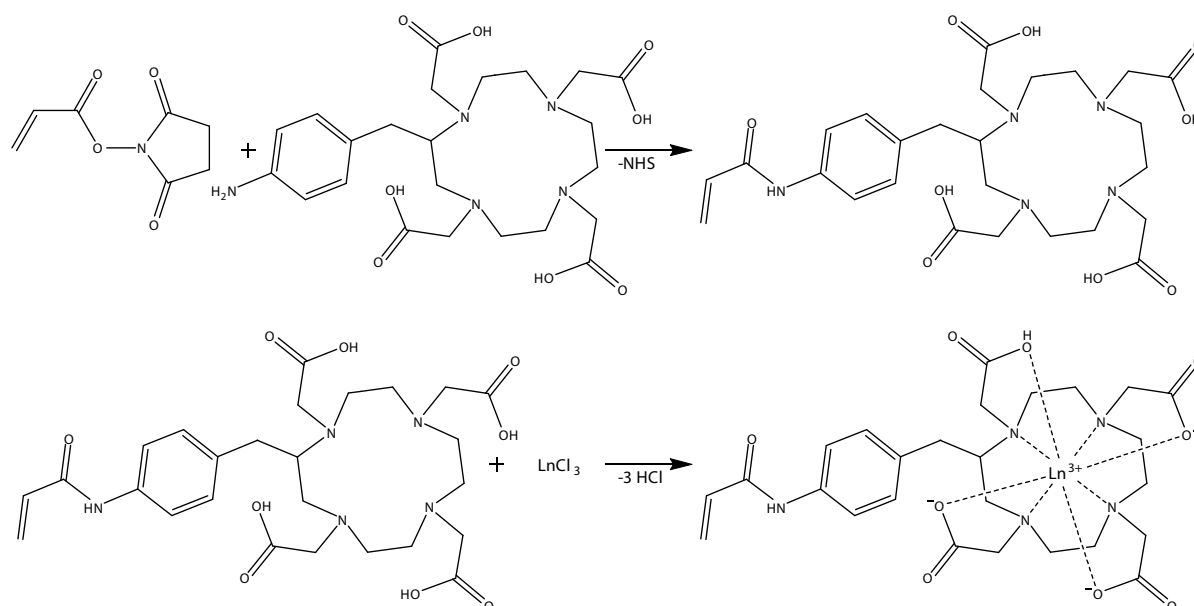


Abb. 24: Reaktionsschema der Synthese des MeCAT-Reagenzes mit Acrylamidfunktionalität. Die Acrylamidfunktionalität wird mithilfe eines NHS-Esters an die Aminfunktion des DOTA-Derivates gebunden. Anschließend erfolgt die Metallierung des DOTA-Makrozyklus.

Alternatives Anwendungsgebiet des Reagenzes

Ein großes Problem bei bildgebenden massenspektrometrischen Verfahren ist die Normierung der Signale. Sowohl bei bildgebenden MALDI-Verfahren als auch bei LA-ICP-MS kann es z. B. infolge von Matrixeinflüssen oder Unebenheiten in der ablatierten Oberfläche zu Fluktuationen im Analytsignal kommen. Diese Signalfuktuationen führen gerade bei quantitativen Analysen zu Verfälschungen der Ergebnisse. Aus diesem Grund wird für eine sinnvolle Anwendung der bildgebenden massenspektrometrischen Verfahren in der Regel ein interner Standard zur Signalnormierung benötigt. Für die LA-ICP-MS wird die Normierung heutzutage vorrangig auf zwei Wegen durchgeführt^[80].

Im ersten Ansatz wird für die Normierung das ^{13}C -Signal genutzt. Diese relativ einfache Normierungsmethode wird meist für die LA-ICP-MS von biologischen Geweben und von Polyacrylamidgelen^[108] genutzt. Allerdings ist ^{13}C häufig nicht homogen im Gewebe verteilt. Auch die Behandlung der Oberfläche mit kohlenstoffenthaltenden Reagenzien (beispielsweise als Trockenmittel) führt zu einer inhomogenen Verteilung von ^{13}C . Darüber hinaus ist das ^{13}C -Signal weniger empfindlich gegenüber instrumentellen Fluktuationen als

das Analytsignal. Eine bessere, aber auch aufwendigere Normierung wird im zweiten Ansatz erreicht^[80]. Hier wird eine Schicht auf die Analytoberfläche aufgetragen, in der der interne Standard homogen verteilt ist. Alternativ kann auch eine dünne Analytschicht auf eine Polymerschicht aufgetragen werden, die den internen Standard enthält. Da hier als interner Standard Elemente gewählt werden, die dem Analytelement sehr ähnlich sind, kann bei diesem Ansatz eine deutlich verlässlichere Normierung als bei der ¹³C-Normierung erreicht werden. Da jedoch der Analyt und der Standard in unterschiedlichen Schichten und damit räumlich getrennt sind, kann es auch hier zu Verfälschungen infolge von Oberflächeninhomogenitäten und nicht konstanten Schichtdicken kommen.

Die LA-ICP-MS kann neben der Analyse biologischer Gewebe auch zur relativen Quantifizierung von metallhaltigen oder metallmarkierten Proteinen, die mittels SDS-PAGE getrennt wurden, verwendet werden^[81]. Auch für diese Proben ist eine Signalnormierung durch interne Standards aus den oben genannten Gründen zwingend erforderlich. Und genau hier liegt die potentielle Anwendung des MeCAT-Reagenzes mit Acrylamidfunktionalität. Aufgrund seiner Acrylamidfunktionalität könnte das Reagenz bei der Herstellung der Polyacrylamidgele mit den Acrylamid-/Bisacrylamidmonomeren copolymerisiert werden. Auf diese Weise ließe sich ein Polyacrylamidgel mit homogener Metallverteilung herstellen. Dieser interne Standard könnte dann zur Signalnormierung der getrennten metallmarkierten Proteine verwendet werden. Weil der DOTA-Komplex sehr stabil und der Komplex über eine kovalente Bindung in Gelmatrix eingebettet ist, sollte der interne Standard sehr tolerant gegenüber gängigen Prozessierungs- und Waschschritten sein. Da sich der Analyt und der interne Standard nach der Gelelektrophorese in der Gelmatrix befinden, sollten auch Effekte wie inhomogene Oberflächen keinen Einfluss auf die Normierung haben. In Abbildung 25 ist das Konzept des internen Standards schematisch dargestellt.

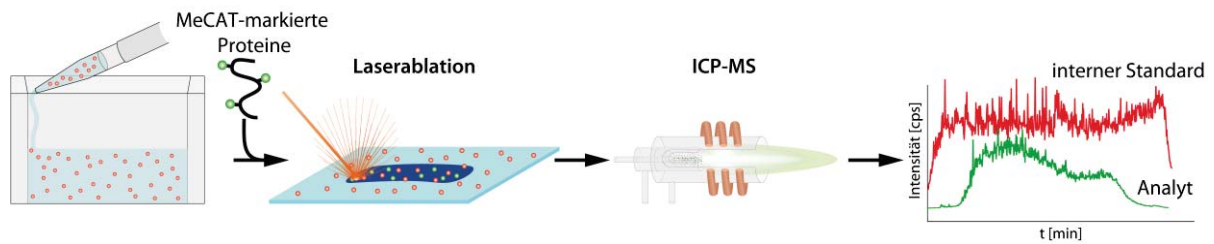


Abb. 25: Schematische Darstellung der möglichen Verwendung des MeCAT-Reagenzes mit Acrylamidfunktionalität als interner Standard der LA-ICP-MS von Polyacrylamidgelen. Durch die Polymerisation des internen Standards in die Gelmatrix ist dieser mit den Analyten kolokalisiert.

Validierung des internen Standards

Für eine erfolgreiche Anwendung des MeCAT-Reagenzes als interner Standard war es zunächst erforderlich, zu überprüfen, ob das Reagenz homogen in der Gelmatrix verteilt ist. Zu diesem Zweck wurde ein Polyacrylamidgel hergestellt, bei dessen Polymerisation eine definierte Menge an MeCAT mit Acrylamidfunktionalität zugegeben wurde. Als Metall wurde Yttrium gewählt, da es monoisotopisch ist und geringe Interferenzen im ICP-MS aufweist. Anschließend wurde ein Proteinmarker auf das Gel gegeben und die Gelelektrophorese durchgeführt. Nach diversen Färbe- und Waschschrten wurden sechs gleich große Bereiche aus dem Gel ausgestanzt, wobei auf eine möglichst breite Verteilung der Bereiche geachtet wurde. In Abbildung 26 ist das Gel mit den Bereichen, die ausgestanzt wurden, dargestellt.

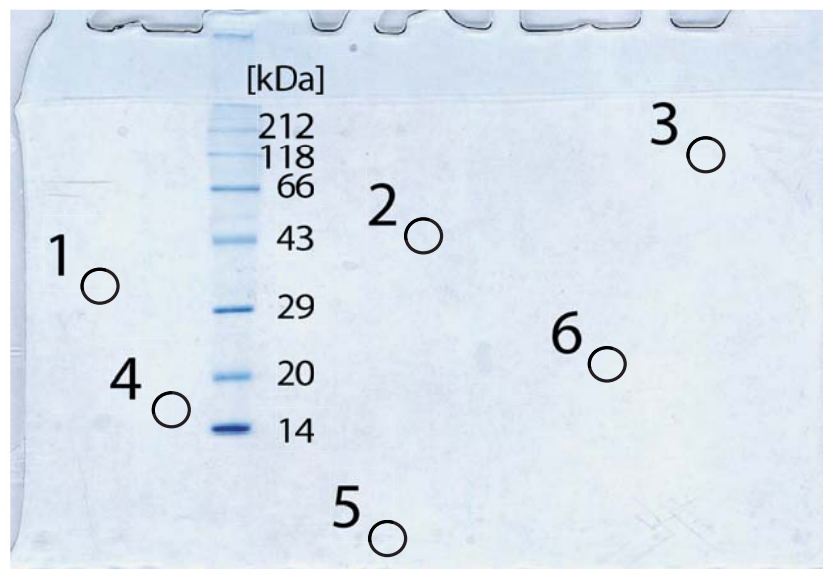


Abb. 26: Polyacrylamidgel, dem bei der Polymerisation Y-MeCAT mit Acrylamidfunktionalität zugegeben wurde. Die markierten Bereiche wurden jeweils ausgestanzt. Zur Visualisierung des Elektrophoresefortschritts und des Massenbereichs wurde ein Proteinmarker in eine der Geltaschen gegeben.

Die ausgestanzten Gelbereiche wurden mit Salpetersäure und Wasserstoffperoxid aufgeschlossen und mittels Direktinjektion-ICP-MS analysiert, wobei als interner Standard ^{209}Bi verwendet wurde. Über eine externe Kalibrierung (Vgl. Materialien und Methoden, Kapitel „Anwendung des internen Standards auf Modellproteine“) konnte die jeweilige Stoffmenge an Yttrium in den sechs Bereichen bestimmt werden. In Abbildung 27 sind die ermittelten Stoffmengen der Bereiche gegeneinander aufgetragen.

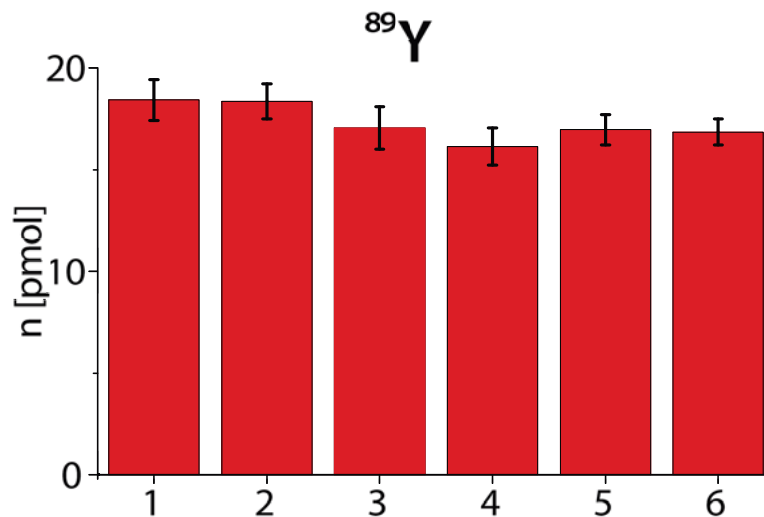


Abb. 27: Darstellung der bestimmten ^{89}Y -Stoffmengen für die 6 ausgestanzten Gelbereiche. Als Berechnungsgrundlage wurde jeweils die gemittelte Signalintensität der Proben genommen. Die Bezeichnung der Proben entspricht der Bezeichnung in Abbildung 26.

In allen sechs Gelbereichen konnten übereinstimmende Yttriummengen nachgewiesen werden. Folglich sollte das copolimerisierte MeCAT-Reagenz mit Acrylamidfunktionalität homogen im Gel verteilt sein, was eine Grundvoraussetzung für die Verwendung als interner Standard ist. Da die Analyse nach der Gelelektrophorese und diversen Wasch- und Färbeschritten durchgeführt wurde, kann auch kein negativer Einfluss der gängigen Prozessierungsschritte der Gelelektrophorese auf den internen Standard festgestellt werden. In weiteren Experimenten konnte das Ergebnis auch für Praseodym und in Zusammenarbeit mit VÖLZKE für Lutetium als interner Standard reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Da mit einer homogenen Verteilung die Grundvoraussetzung für den Einsatz des Reagenzes als interner Standard erfüllt war, wurden Untersuchungen zum Einfluss des internen Standards auf die LA-ICP-MS-Analyse von metallmarkierten Proteinen durchgeführt. Als Modellproteine wurden hierfür α -Lactalbumin und bovines Serumalbumin gewählt. Diese wurden an ihren Cysteinresten mit MeCAT-IA markiert und in diversen Verhältnissen auf

Polyacrylamidgele gegeben, die den internen Standard enthielten. Die Ablationsbilder des internen Standards bestätigten, dass dieser homogen in den Gelbanden verteilt ist (Vgl. Anhang Abb. A1 bis A11). Im ersten Experiment wurden die Modellproteine mit Lutetium markiert und Yttrium als interner Standard verwendet. Alle Proteine wurden im 1 zu 1 Verhältnis auf die Gele gegeben. In Abbildung 28 sind beispielhaft die Ablationsbilder von zwei α -Lactalbuminbanden dargestellt.

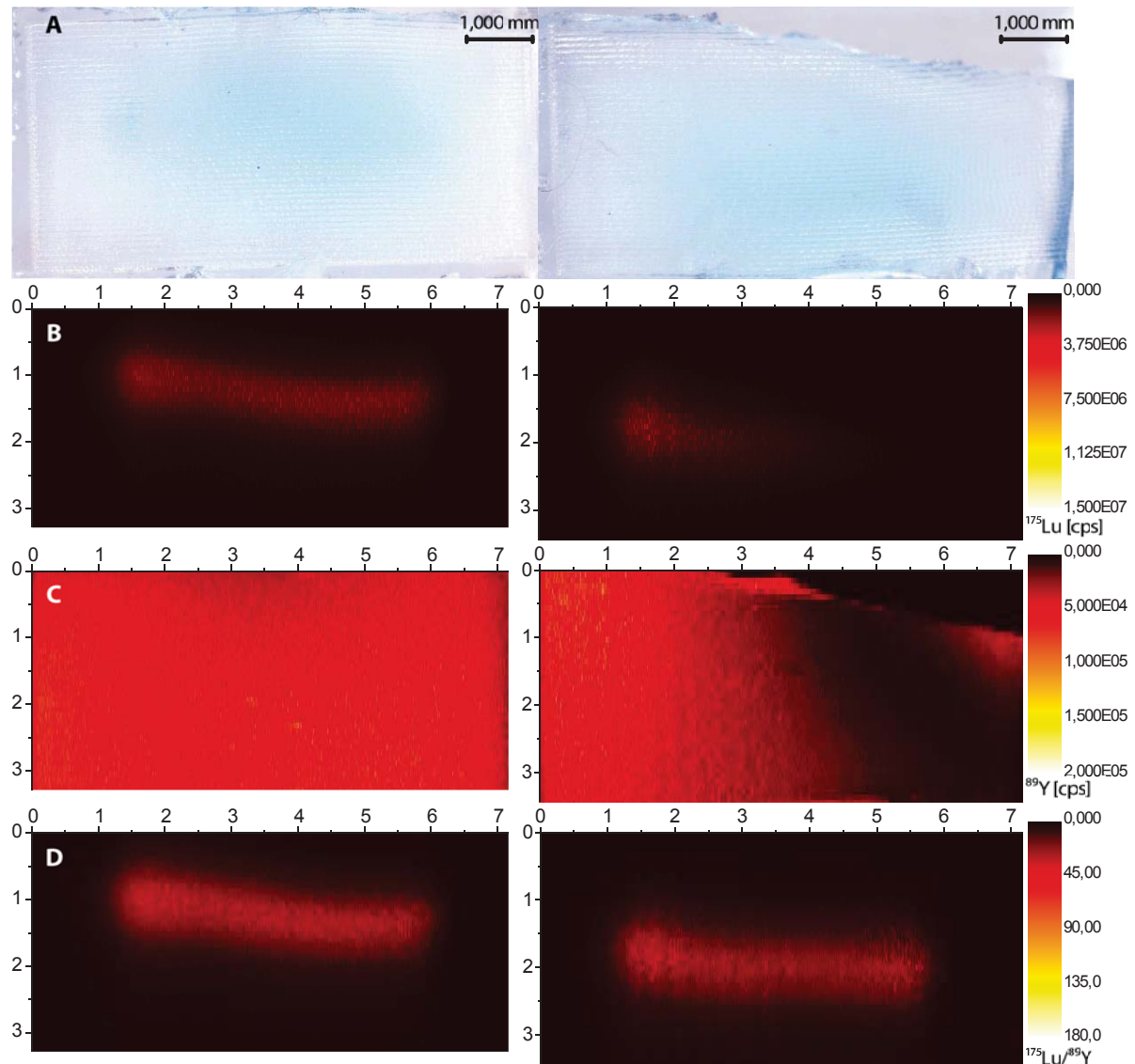


Abb. 28: Laserablationsbilder von zwei lutetiummarkierten α -Lactalbuminbanden (links und rechts), die im Verhältnis 1 zu 1 auf das Gel gegeben wurden. Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. Die Intensitätsskalen gelten jeweils für beide Banden. **A:** Optische Aufnahmen der Gelbanden nach der Ablation. **B:** Laserablationsbilder des ^{175}Lu -Signals (Analytsignal). **C:** Laserablationsbilder des ^{89}Y -Signals (interner Standard). **D:** Laserablationsbilder des normierten Analytsignals.

Das rechte Gel in Abbildung 23 schien sich während des Ablationsprozess vom Objektträger gelöst zu haben. Dementsprechend kann im Ablationsbild vom Analyten (^{175}Lu) nur eine halbe Proteinbande gesehen werden, wodurch sich das bestimmte Proteinverhältnis der linken und der rechten Bande deutlich von 1 unterscheidet. Da allerdings der Signalabfall auch im Ablationsbild vom internen Standard (^{89}Y) sichtbar ist, kann diese Fehlerquelle im normierten Ablationsbild ausgeglichen werden. Das Proteinverhältnis von 1 zu 1 spiegelt sich hier sehr gut wider.

Bei einer der Proteinbanden von bovinen Serumalbumin kam es infolge der Prozessierung zur Bildung eines Kraters in der Oberfläche. In Abbildung 29 sind die zugehörigen Ablationsbilder zu sehen. Da sich der Krater auf der Proteinbande befindet, kommt es an dieser Position zu einem Abfall des Analytsignals. Dies wiederum kann – abhängig von der Größe der Oberflächenunebenheit – zu einer erheblichen Verfälschung der Quantifizierungsergebnisse führen. Da der interne Standard mit dem Analyten colokalisiert ist, lassen sich diese Unebenheiten durch Normierung ausgleichen. So ist im normierten Ablationsbild der Krater nur noch minimal sichtbar.

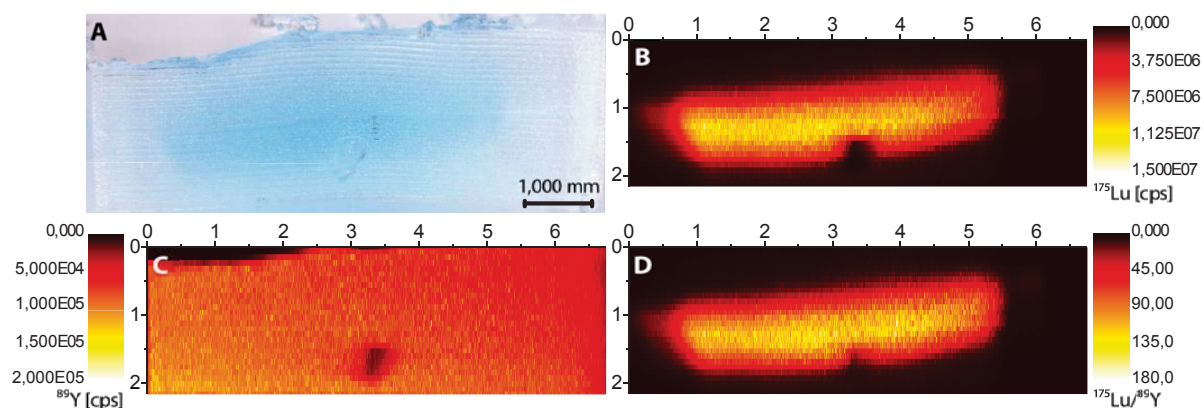


Abb. 29: Laserablationsbilder der Bande von lutetiummarkierten bovinen Serumalbumin, bei der durch die Prozessierung ein Krater in der Geloberfläche entstand. Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande nach Ablation. Am unteren Ende der Bande ist der Krater deutlich erkennbar. **B:** Laserablationsbilder des ^{175}Lu -Signals (Analytsignal). **C:** Laserablationsbilder des ^{89}Y -Signals (interner Standard). **D:** Laserablationsbilder des normierten Analytsignals.

In späteren Experimenten wurden auch größere Proteinverhältnisse, wie 1 zu 5 oder 1 zu 10, untersucht. Jene Ansätze, bei denen Lutetium als interner Standard verwendet wurde, wurden in Zusammenarbeit mit VÖLZKE durchgeführt. In Abbildung 30 sind zwei Gelbanden von α -Lactalbumin zu sehen, das im Verhältnis von 1 zu 10 auf das Gel gegeben wurde, wobei

Thulium als Analytion und Lutetium als interner Standard verwendet wurde. Die nichtnormierten Ablationsbilder spiegeln in keiner Weise das theoretische Proteinverhältnis wider. Selbst in den optischen Bildern der Gele ist der Intensitätsunterschied deutlicher erkennbar als in den Ablationsbildern. Erst infolge der Normierung entsprechen die Intensitätsverhältnisse den theoretischen Proteinverhältnissen.

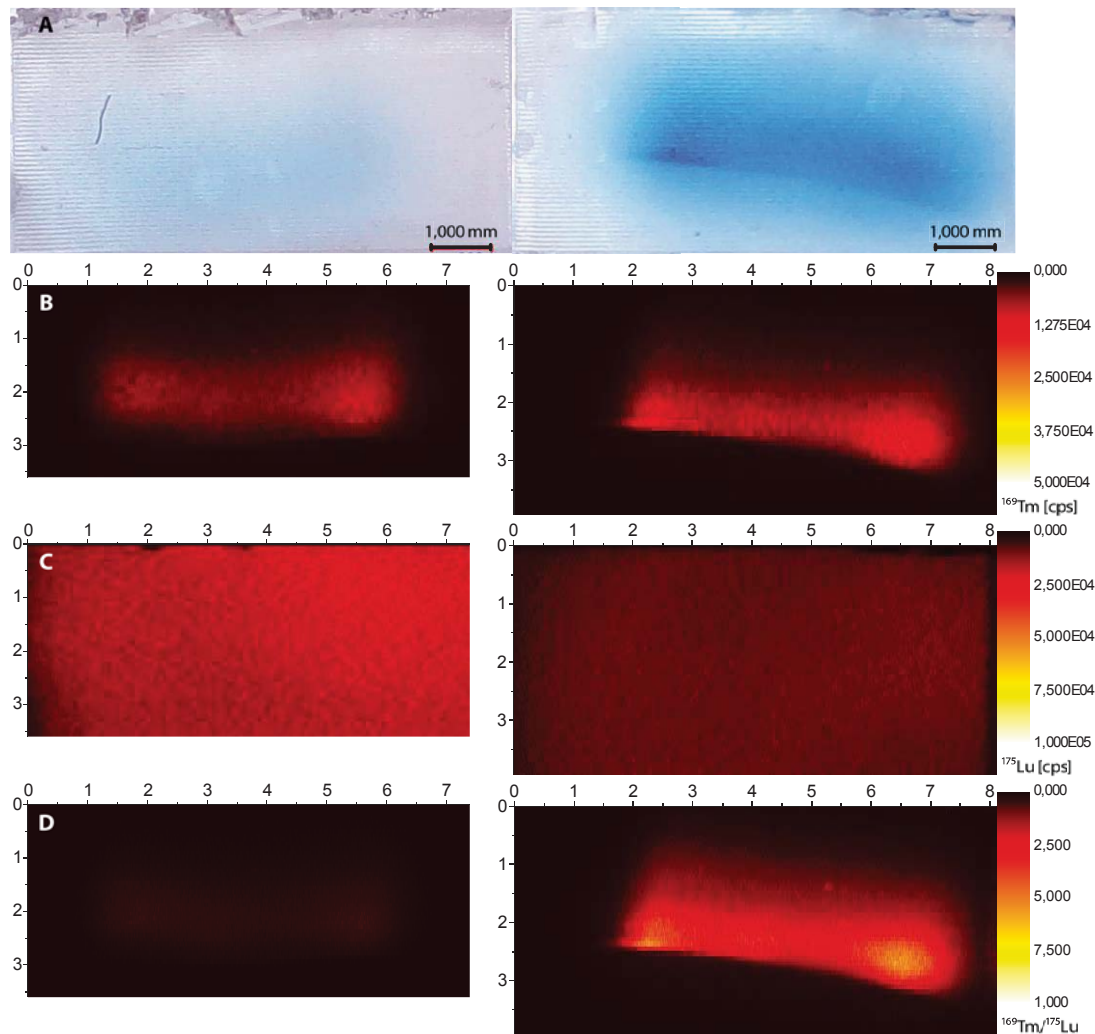


Abb. 30: Laserablationsbilder von zwei thuliummarkierten α -Lactalbuminbanden, die im Verhältnis 1 (links) zu 10 (rechts) auf das Gel gegeben wurden. Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. Die Intensitätsskalen gelten jeweils für beide Banden. **A:** Optische Aufnahmen der Gelbanden nach der Ablation. **B:** Laserablationsbilder des ^{169}Tm -Signals (Analytsignal). **C:** Laserablationsbilder des ^{175}Lu -Signals (interner Standard). **D:** Laserablationsbilder des normierten Analytsignals.

Neben der eher qualitativen Beurteilung der Intensitätsunterschiede in den Ablationsbildern wurde mithilfe der Origin Software (OriginLab Corporation) für jedes Ablationsbild durch die

ROI (engl. *region of interest*)-Funktion die Summe der Signalintensitäten der Proteinbanden bestimmt (Anhang Tab. A3). Die ermittelten Signalintensitäten wurden anschließend für die relative Quantifizierung ins Verhältnis gesetzt. In Abbildung 31 sind die bestimmten Quantifizierungsergebnisse der verschiedenen Ansätze dargestellt.

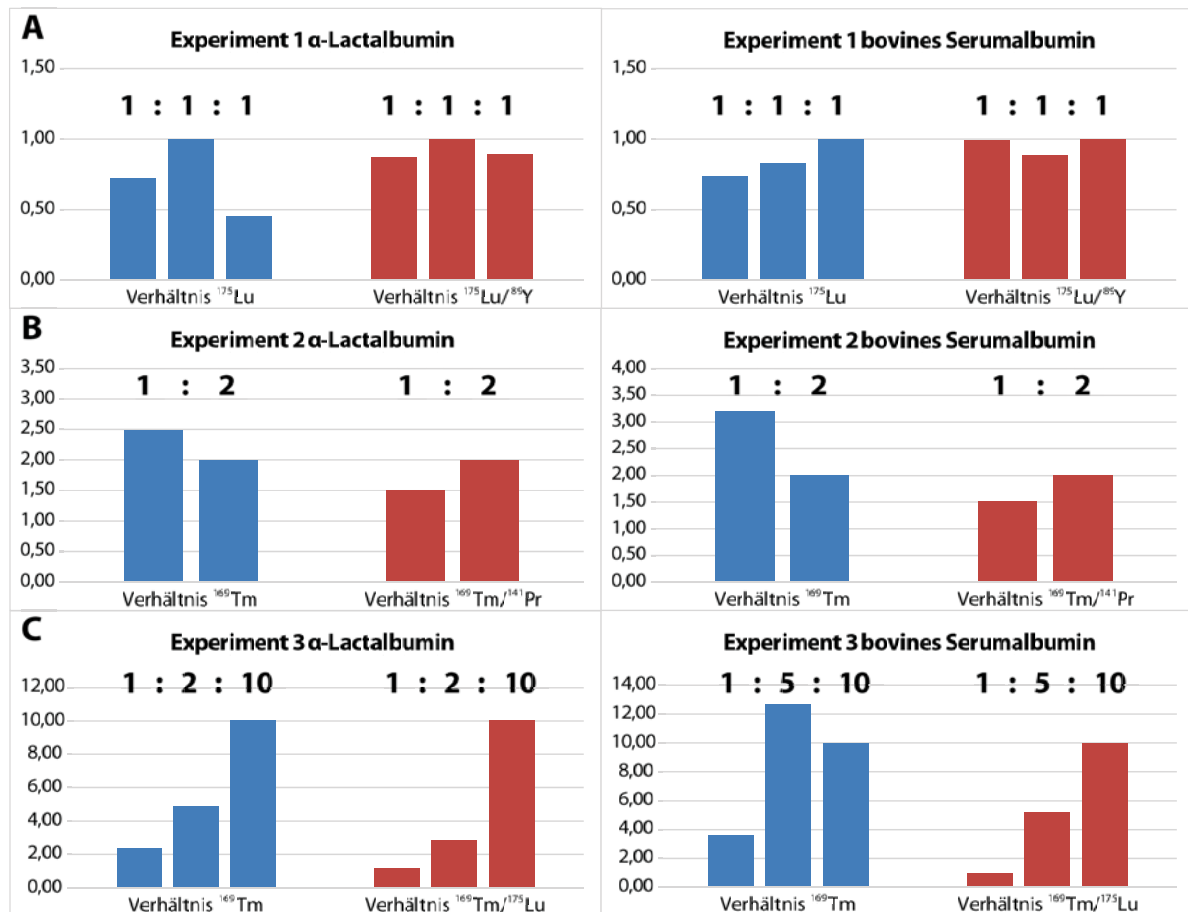


Abb. 31: Relative Quantifizierungsergebnisse der verschiedenen Experimente. Für die Quantifizierung wurden die über die ROI ermittelten Intensitäten (Anhang Tab. A3) genutzt. Die Zahlenwerte über den Balken entsprechen den theoretischen Verhältnissen. **A:** Quantifizierungsergebnisse von drei α-Lactalbuminbanden (links) und drei bovines Serumalbuminbanden (rechts). Es wurden Lutetium (Analyt) und Yttrium (interner Standard) verwendet. **B:** Quantifizierungsergebnisse von zwei α-Lactalbuminbanden (links) und zwei bovines Serumalbuminbanden (rechts). Es wurden Thulium (Analyt) und Praseodym (interner Standard) verwendet. **C:** Quantifizierungsergebnisse von drei α-Lactalbuminbanden (links) und drei bovines Serumalbuminbanden (rechts). Es wurden Thulium (Analyt) und Lutetium (interner Standard) verwendet. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit VÖLZKE durchgeführt.

Die nicht-normierten Quantifizierungsergebnisse wichen in den meisten Experimenten deutlich von den theoretischen Quantifizierungsverhältnissen ab. Die über die ROI bestimmten Quantifizierungsergebnisse im dritten Experiment bestätigten die in Abbildung 30 gemachten Beobachtungen. Im Gegensatz dazu stimmten die normierten

Quantifizierungsergebnisse gut mit den theoretischen Verhältnissen überein. Eine Ausnahme hierbei war allerdings das 2. Experiment, wo auch die normierten Quantifizierungsergebnisse nicht besonders gut mit den theoretischen Verhältnissen übereinstimmten. Die Ursache hierfür lag wahrscheinlich darin, dass in diesem Experiment die Konzentration an internem Standard deutlich geringer als in den anderen Ansätzen und vermutlich zu nahe an der Bestimmungsgrenze war. Trotzdem führte auch hier die Normierung zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse im Vergleich zum nicht-normierten Signal. In allen Experimenten konnte somit unabhängig von der verwendeten MeCAT-Markierung und dem verwendeten internen Standard stets eine Verbesserung der Quantifizierungsergebnisse durch die Normierung erreicht werden. Eine Normierung ist folglich immer sinnvoll.

Für die Normierung durch das ^{13}C -Signal sind bereits einige potentielle Nachteile literaturbekannt^[80]. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, inwiefern Kontaminationen der zu ablatierenden Oberfläche die Normierung durch den neuen internen Standard im Vergleich zu einer Normierung durch das ^{13}C -Signal beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde mit Thulium markiertes bovines Serumalbumin in einem Lutetium enthaltenden Gel getrennt. Die zugehörige Gelbande wurde wie die vorherigen Gelbanden für die LA-ICP-MS-Analyse vorbereitet. Unmittelbar vor der Ablation wurden jedoch, um eine Kontamination der Oberfläche zu simulieren, Haare einer aus Schafswolle bestehenden Textile auf die Oberfläche gegeben. Anschließend wurde das Gel mittels LA-ICP-MS analysiert, wobei neben dem ^{169}Tm - und dem ^{175}Lu -Signal auch das ^{13}C -Signal detektiert wurde. In Abbildung 32 sind die Ablationsbilder und eine Aufnahme des Gelstückes nach der Ablation zu sehen.

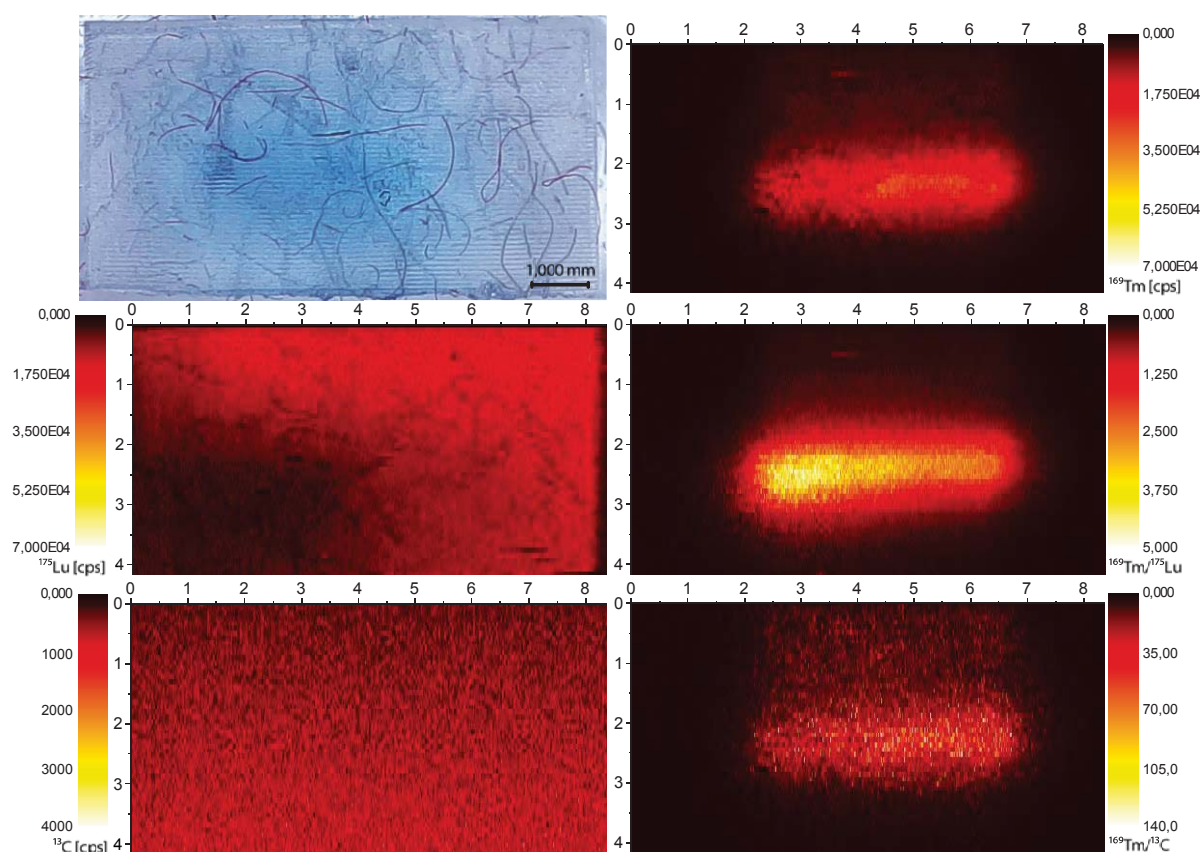


Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse des LA-ICP-MS-Experiments zur Untersuchung des Einflusses von Oberflächenkontaminationen. Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. Oben links ist eine photographische Aufnahme des Gels nach der Ablation zu sehen. Darunter sind die Ablationsbilder der internen Standardsignale ^{175}Lu und ^{13}C dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Ablationsbilder des nicht-normierten und der normierten Analytsignale zu sehen.

Sowohl im Ablationsbild des Analyten (^{169}Tm) als auch im Ablationsbild des neuen internen Standards (^{175}Lu) sind die Oberflächenkontaminationen deutlich durch Signaleinbrüche erkennbar. Da es sich bei der Kontamination jedoch um organische Verbindungen handelt, die somit ^{13}C enthalten, ist diese im ^{13}C -Ablationsbild nicht sichtbar. Daher sind die Kontaminationen im mit ^{13}C normierten Ablationsbild immer noch sichtbar, während sie im ^{175}Lu -normierten Ablationsbild ausgeglichen werden konnten. Darüber hinaus sind auch die aus der Literatur bekannten Nachteile von ^{13}C für die Normierung erkennbar^[80]. Die für den Analyten optimierten Ionisierungs- und MS-Parameter waren für ^{13}C nicht optimal, wodurch sich sehr geringe Signalintensitäten ergeben. Auch, dass das ^{13}C -Signal weniger empfindlich gegenüber instrumentellen Fluktuationen ist als das Analytsignal, ist erkennbar. Bei den Lanthanidsignalen (sowohl Analyt als auch interner Standard) gibt es auf der linken Seite des Gelstücks einen Intensitätseinbruch, der jedoch im ^{13}C -Signal nicht vorkommt. Folglich ist der

neue interne Standard der Normierung durch das ^{13}C -Signal überlegen. Im Vergleich zur anderen gängigen Methode der Signalnormierung, dem Auftragen einer Standardschicht auf die Oberfläche, ist der neue Standard sehr tolerant gegenüber Inhomogenitäten der Oberfläche.

Anwendung des Standards auf die *B. bacteriovorus* Probe

Nachdem das Potential des neuen internen Standards in verschiedenen Experimenten mit Modellproteinen validiert werden konnte, sollte im nächsten Schritt die Wirkung des Standards auf eine komplexere Probe untersucht werden. Als komplexe Probe wurden hierfür die in Kapitel 3.6 verwendeten Proben von *B. bacteriovorus* gewählt. Die AP- und die GP0.5h-Probe wurden differentiell mit Ho- bzw. Lu-MeCAT-IA markiert. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch getrennt, wobei das Gel Thulium als internen Standard enthielt. Die beiden Proben wurden einerseits jeweils separat und andererseits in einer 1 zu 1 Mischung auf das Gel gegeben und getrennt. Die drei erhaltenen Gelbanden wurden für die LA-ICP-MS-Analyse vorbereitet. Anschließend wurden die drei Banden jeweils in Trennrichtung ablatiert. Zur Verringerung der Messzeit und der Datenkomplexität wurden von jeder Gelbande jeweils fünf Linien im Zentrum der Proteinbanden ablatiert. In Abbildung 33 sind die drei Gelbanden nach der Ablation zu sehen.

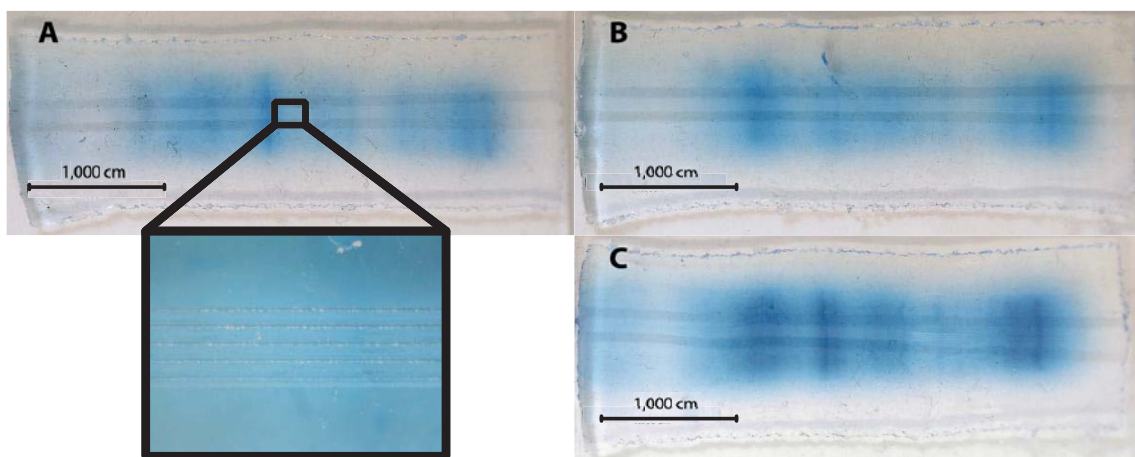


Abb. 33: Aufnahme der drei Gelbanden nach der Ablation. Die Laufrichtung der Gele war jeweils von links nach rechts. Es wurden jeweils fünf Linien ablatiert, wobei die Isotope ^{165}Ho , ^{169}Tm und ^{175}Lu detektiert wurden. **A:** Gelbande des Ho-markierten AP-Zelllysats. Im Ausschnitt sind die fünf Ablationslinien gut erkennbar. **B:** Gelbande des Lu-markierten Lysats der GP0.5h-Probe. **C:** Gelbande der 1 zu 1 Mischung beider Proben.

Da die Ablationslinien nicht exakt parallel zur Laufrichtung des Gels und auch nicht ganz in der Mitte der Proteinbanden lagen, wurde über die fünf Ablationslinien jeweils der Median der Signalintensitäten gebildet. Anschließend wurden das Holmiumsignal (Abb. 33 A) und das Lutetiumsignal (Abb. 33 B) der separat getrennten Proben einerseits direkt ins Verhältnis gesetzt und andererseits zunächst mit dem internen Standard normiert und dann ins Verhältnis gesetzt. Diese Quantifizierungsverhältnisse wurden mit dem Quantifizierungsverhältnis der Mischung (Abb. 33 C) verglichen. In Abbildung 34 sind die Verhältnisse entlang der Ablationsachse aufgetragen.

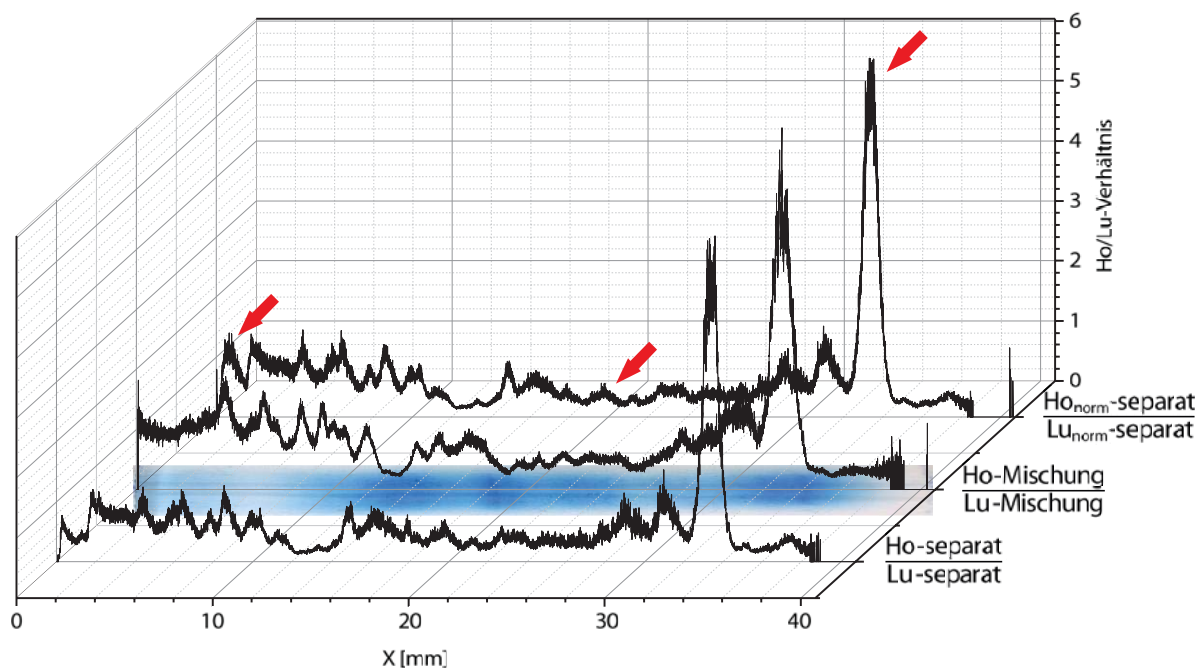


Abb. 34: Grafische Auftragung der $^{165}\text{Ho}/^{175}\text{Lu}$ -Signalverhältnisse entlang der Ablationsachse X. Im unteren Graph wurden die Signale der separat getrennten Proben ins Verhältnis gesetzt. Im oberen Graph wurden die Signale der separat getrennten Proben zunächst mit dem internen Standard normiert und dann ins Verhältnis gesetzt. Im mittleren Graphen wurden die Signale der Probenmischung ins Verhältnis gesetzt. Zur Veranschaulichung wurde hier die ablatierte Gelbande der Mischung mit der gleichen Skalierung unter den Graphen gelegt. Die mit Pfeilen markierten Bereiche sind Abschnitte, in denen die Normierung zur Verbesserung der Signalverhältnisse führt.

Auch ohne Normierung ist das Quantifizierungsverhältnis der separat getrennten Proben dem Quantifizierungsverhältnis der Mischung schon sehr ähnlich. Gründe hierfür sind vermutlich einerseits, dass für die Signale jeweils der Median aus fünf Messungen genutzt wurde und andererseits, dass aufgrund der relativ kurzen Messzeit die Proben in kurzer Zeit hintereinander gemessen werden konnten. Beide Gründe machen negative Einflüsse auf die Quantifizierung, beispielsweise durch Fluktuationen, weniger wahrscheinlich. Dennoch führt

die Normierung zu einer weiteren Annäherung der Quantifizierungsverhältnisse der separat getrennten Proben an die Mischung. In Abbildung 34 ist dies insbesondere an den mit Pfeilen gekennzeichneten Bereichen erkennbar. Bei den ersten beiden Pfeilen nähert sich der obere Graph dem mittleren Graph durch eine Vergrößerung bzw. Verringerung des Signalverhältnisses an. Für den großen Peak bei etwa 33 mm wurde mithilfe der ROI-Funktion die Peakfläche bestimmt. Die Peakfläche des normierten Signalverhältnisses stimmt deutlich besser mit der Peakfläche der Mischung überein (Anhang Tab. A4). Folglich führt der neue interne Standard auch für komplexere Proben zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse.

Gerade bei einer Anwendung der MeCAT-Strategie auf komplexe Proben wie *B. bacteriovorus* könnte der interne Standard nützlich sein. Einer der Nachteile der MeCAT-Strategie im Zusammenhang mit komplexen Proben ist, dass die Reagenzien mit verschiedenen Metallen nicht komigrieren bei der Gelelektrophorese. Aus diesem Grund wurde bei der Anwendung von MeCAT auf die *B. bacteriovorus* Proben (Vgl. Kapitel 3.4) die Gelelektrophorese nur zur Aufreinigung und nicht zur Trennung genutzt, was letztlich zu einer unzureichenden Trennung der tryptischen Peptide bei der massenspektrometrischen Analyse führte. Durch die Normierung des internen Standards im Gel sollte es für die relative Quantifizierung mittels LA-ICP-MS nicht mehr notwendig sein, dass die verschiedenen Proben für die gelelektrophoretische Trennung gemischt und in einer Gelbande separiert werden. Folglich könnte für alle Proben das gleiche Metall zur Markierung genutzt und die verschiedenen Proben separat getrennt werden, wodurch eine Komigration auf dem Gel gewährleistet sein sollte.

4 Diskussion und Ausblick

4.1 Vergleich der Proteomikdaten mit Transkriptionsdaten

Im Zuge dieser Arbeit wurde erstmals eine quantitative Analyse des Proteoms von *B. bacteriovorus* durchgeführt. Durch die Analyse von verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus konnten diverse Proteine identifiziert werden, die zu spezifischen Zeitpunkten des Lebenszyklus hoch- oder herabreguliert werden. Folglich sind diese Proteine an Prozessen beteiligt, die an den spezifischen Zeitpunkten ablaufen und liefern damit Hinweise zur weiteren Aufklärung der Lebensweise von *B. bacteriovorus*. In der Fachliteratur ist das Proteom von *B. bacteriovorus* bisher kaum untersucht worden. Stattdessen konzentrierte sich die Forschung vorrangig auf genetische und transkriptomische Untersuchungen. 2013 wurden von KARUNKER *et al.* quantitative Transkriptionsdaten zu *B. bacteriovorus* HD100 veröffentlicht^[59]. Sie verglichen das Transkriptom von AP-Zellen mit dem Transkriptom von GP-Zellen 3 h nach der Wirtspenetration. Dabei stellten sie fest, dass 67 % der exprimierten Gene ausschließlich in der GP exprimiert wurden, während 15 % der Gene ausschließlich in der AP exprimiert wurden. Folglich besitzen AP und GP sehr spezifische Genexpressionen, die sich deutlich unterscheiden. Die Beobachtung, dass sich AP und GP deutlich unterscheiden, konnte in dieser Arbeit auf Proteomebene bestätigt werden. So sind die meisten der gefundenen hoch- oder herabregulierten Proteine zwischen AP und GP reguliert und nicht innerhalb der GP.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit gefundenen regulierten Proteine mit den Transkriptionsdaten ihrer zugehörigen Gene verglichen werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit werden dabei nur jene Proteine berücksichtigt, bei denen eine Regulation zwischen AP und GP3h stattgefunden hat (Vgl. Kapitel 3.5 Tab. 10). In Tabelle 17 sind die Proteomik- und die Transkriptomikdaten gegenübergestellt.

Tab. 17: Vergleich der Proteomik- mit den Transkriptomikdaten^[59] von *B. bacteriovorus* HD100. Die Proteine wurden nach dem zugehörigen Genlokus geordnet. Bei GP handelt sich für beide Untersuchungen jeweils um eine GP-Probe 3 h nach der Wirtspenetration (GP3h). „dominant“ bedeutet, dass das Gen in beiden Phasen exprimiert wird, jedoch in der dominanten Phase im mehr als fünffachen Überschuss.

Genlokus	Accession	Beschreibung	Protein hochreguliert in	Genspezifität	Konsistenz
Bd0022	Q6MRQ2	Electron transfer flavoprotein beta-subunit GN=etfB	GP	GP	Ja
Bd0063	Q6MRL4	Uncharacterized protein GN=Bd0063	AP	Stumm	Nicht vergleichbar
Bd0112	Q6MRH2	Putative pilus assembly membrane protein GN=PilQ	AP	AP	Ja
Bd0163	Q6MRC5	YdiY protein GN=ydiY	AP	GP	Nein
Bd0294	Q6MR07	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein GN=Bd0294	GP	GP dominant	Ja
Bd0356	Q6MQV0	Putative arginase GN=Bd0356	GP	GP	Ja
Bd0427	Q6MQN4	Uncharacterized protein GN=Bd0427	AP	GP	Nein
Bd0458	Q6MQK8	Valine-tRNA ligase GN=valS	GP	GP	Ja
Bd0459	Q6MQK7	Uncharacterized protein GN=Bd0459	AP	GP	Nein
Bd0585	Q6MQ94	D-alanine-D-alanine ligase GN=ddl	GP	GP	Ja
Bd0586	Q6MQ93	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2 GN=elb	GP	GP	Ja
Bd0683	Q6MQ04	Glycine cleavage system H protein GN=gcvH	AP	GP	Nein
Bd0829	Q6MPL9	Uncharacterized protein GN=Bd0829	AP	Stumm	Nicht vergleichbar
Bd1054	Q6MP15	Asparagine-tRNA ligase GN=asnS	GP	GP	Ja
Bd1235	Q6MNL3	Uncharacterized protein GN=Bd1235	AP	GP	Nein
Bd1467	Q6MMZ9	30S ribosomal protein S20 GN=rpsT	AP	GP dominant	Nein
Bd1608	Q6MML9	Molybdopterin oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit GN=hmoA	GP	GP	Ja
Bd2001	Q6MLK7	YCE I like family protein GN=Bd2001	GP	GP	Ja
Bd2005	Q6MLK3	Uncharacterized protein GN=Bd2005	GP	GP	Ja
Bd2175	Q6ML46	Uncharacterized protein GN=Bd2175	GP	GP	Ja
Bd2212	Q6ML11	Uncharacterized protein GN=Bd2212	GP	AP	Nein
Bd2502	Q6MKA5	2-methylisocitrate lyase GN=prpB	GP	GP	Ja
Bd2509	Q6MKA0	Uncharacterized protein GN=Bd2509	AP	Stumm	Nicht vergleichbar

Bd2577	Q6MK36	Uncharacterized protein GN=Bd2577	GP	GP dominant	Ja
Bd2675	Q6MJU3	Putative membrane protein with protease subunit GN=Bd2675	GP	AP	Nein
Bd2707	Q6MJR2	Ribosome-binding ATPase YchF GN=ychF	GP	GP	Ja
Bd2726	Q6MJP4	Uncharacterized protein GN=Bd2726	AP	AP	Ja
Bd2727	Q6MJP3	2,3-bisphosphoglycerate- dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA	GP	GP	Ja
Bd2751	Q6MJM2	Urocanate hydratase GN=hutU	GP	GP	Ja
Bd2950	Q6MJ36	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha GN=rpoA	GP	GP	Ja
Bd2972	Q6MJ18	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	GP	GP	Ja
Bd3000	Q6MIZ4	Uncharacterized protein GN=Bd3000	GP	GP	Ja
Bd3020	Q6MIX5	Flagellar motor protein MotB GN=motB	GP	Stumm	Nicht vergleichbar
Bd3048	Q6MIV0	Chaperone protein ClpB GN=clpB	GP	GP	Ja
Bd3052	Q6MIU6	Flagellin GN=flgL	GP	Keine	Nein
Bd3058	Q6MIU0	Efflux transporter GN=nolG	GP	Keine	Nein
Bd3081	Q6MIR8	NADH dehydrogenase I chain G GN=nuoG	AP	GP	Nein
Bd3178	Q6MIH9	Aconitate hydratase GN=acnA	GP	AP	Nein
Bd3311	Q6MI59	Aspartate-tRNA(Asp/Asn) ligase GN=aspS	AP	GP	Nein
Bd3424	Q6MHW0	Glutamine-fructose-6- phosphate aminotransferase [isomerizing] GN=glmS	GP	GP	Ja
Bd3532	Q6MHK9	Uncharacterized protein GN=Bd3532	AP	AP	Ja
Bd3617	Q6MHD3	Superoxide dismutase GN=sodB	GP	GP	Ja
Bd3749	Q6MH16	Lon protease GN=lon	GP	Keine	Nein
Bd3861	Q6MGR3	Pyruvate carboxylase GN=Bd3861	GP	GP	Ja
Bd3897	Q6MGM7	ATP synthase subunit beta GN=atpD	GP	GP	Ja

Bei etwa zwei Drittel der regulierten Proteine (27 Proteine) stimmten die Transkriptomik- mit den Proteomikdaten überein, d. h., die Proteine wurden in jener Phase hochreguliert, in der auch ihr dazugehöriges Gen exprimiert wurde. Dies traf vor allem auf GP3h-spezifische Proteine bzw. Gene zu. Bei etwa einem Fünftel der regulierten Proteine (10 Proteine) waren die Transkriptionsdaten gegenläufig zu den Proteomikdaten, d. h., die Proteine waren in der

Phase herabreguliert, in der ihr dazugehöriges Gen exprimiert wurde. Dies traf vor allem auf Proteine zu, die in AP hochreguliert waren. Hierfür kann es mehrere mögliche Erklärungen geben. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Proteine während der GP für die AP synthetisiert werden, bis am Ende der GP ein Maximum erreicht wird. In der AP werden die Proteine dann nicht mehr translatiert, jedoch auch nicht abgebaut, wodurch das Maximum erhalten bliebe. Alternativ könnte auch die RNA in der GP transkribiert, das Protein aber erst in der AP translatiert werden. Beide Strategien wären durchaus sinnvoll, da *B. bacteriovorus* so die aufwendige RNA- bzw. Proteinsynthese durchführen würde, wenn infolge des Wirtes ein Substrat- und Nährstoffüberschuss vorliegt.

Bei drei Proteinen (Bd3052, Bd3058 und BD3749) konnte keine phasenspezifische Genexpression festgestellt werden, jedoch eine Hoch- bzw. Herabregulierung im Proteinmuster. Diese Regulierung wird vermutlich vorrangig über den Proteinabbau gesteuert sein. Interessant ist weiterhin, dass für vier Proteine (Bd0063, Bd0829, Bd2509, Bd3020) basierend auf den Transkriptionsdaten festgestellt wurde, dass ihre Gene stumm sind. Die Proteine sind jedoch entweder in AP oder GP3h hochreguliert. Da die Proteine in mehreren Replikaten gefunden wurden, werden die zugehörigen Gene auch mit hoher Wahrscheinlichkeit exprimiert. Eventuell erfolgt die Expression jedoch zu Zeitpunkten des Lebenszyklus, die nicht von KARUNKER *et al.* betrachtet wurden.

Der Vergleich der Transkriptionsdaten mit den in dieser Arbeit generierten Proteomikdaten zeigt, dass es für die Aufklärung der Prozesse im Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* sehr wichtig ist, sich nicht auf einen Bereich der Biomoleküle zu beschränken. So konnten zahlreiche Übereinstimmungen, jedoch auch einige Unterschiede zwischen dem Proteom und dem Transkriptom festgestellt werden. Dennoch konzentriert sich die Forschung nach der Sequenzierung des Genoms von *B. bacteriovorus* sehr stark auf das Transkriptom, während das Proteom oder gar Bereiche wie das Metabolom oder das Lipidom eher wenig Beachtung erfahren. Einer der Gründe dafür ist vermutlich, dass durch die neuen *Next-Generation Sequencing* Methoden, wie *RNA sequencing* (RNA-seq), quantitative Transkriptionsdaten mit hoher Genauigkeit und relativ geringem Aufwand generiert werden können^[133]. Verglichen damit ist die nicht-zielgerichtete (engl. *non-target*) Protein- bzw. Metabolitanalytik deutlich komplexer.

4.2 Perspektiven in der Proteomanalytik von *B. bacteriovorus*

Die nicht-zielgerichtete quantitative Analyse des Proteoms von *B. bacteriovorus* HD100 konnte in dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt werden. Dadurch konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die zu spezifischen Zeitpunkten des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* hoch- oder herabreguliert werden. Ein Protein, welches beispielsweise 1 h nach der Penetration des Wirtes hochreguliert ist, ist wahrscheinlich an spezifischen Prozessen, die zu diesem Zeitpunkt des Lebenszyklus ablaufen, wie zum Beispiel der Beginn der Filamentbildung, beteiligt. Die Proteomikdaten können somit dazu beitragen, den einzigartigen Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* weiter aufzuklären. Bedingt durch die hohe Komplexität der Proben und der damit verbundenen aufwendigen Analyse gibt es allerdings einige Herausforderungen in der künftigen Proteomanalytik zu *B. bacteriovorus*, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben.

Ein Problem bei der hier durchgeführten quantitativen Proteomanalyse von *B. bacteriovorus* war, dass viele der quantifizierten Proteine aufgrund der Probenkomplexität nur in einem Replikate quantifiziert wurden und somit nicht für die Datenanalyse genutzt werden konnten. Diese Proteine könnten jedoch als Grundlage für eine künftige zielgerichtete (engl. *target*) Analyse dienen. Alternativ müssten für eine verlässlichere Bestimmung dieser Proteine mit der in dieser Arbeit genutzten nicht-zielgerichteten Analyse deutlich mehr Replikate durchgeführt und die Proben noch stärker aufgetrennt werden. Allerdings wäre dies mit einem hohen Kosten- und Zeitaufwand verbunden. Ein weiteres Problem war die Normierung der *E. coli* Daten. Da sich im Laufe des Lebenszyklus das Proteinmengenverhältnis zwischen *B. bacteriovorus* und seinem Wirt ändert, kann auch bei bekannter Gesamtproteinmenge nicht auf die Anteile in den verschiedenen Proben geschlossen werden. Daher werden für die Datennormierung Normierungsproteine benötigt, deren Menge sich nicht über den Lebenszyklus ändert. Während die Normierung bei *B. bacteriovorus* HD100 erfolgreich war, konnte bei *E. coli* kein gut funktionierendes Normierungsprotein gefunden werden. Für eine funktionierende Normierung wäre ein Protein nötig, welches vom Wirt exprimiert, jedoch nicht von *B. bacteriovorus* abgebaut werden kann. Ob ein solches proteolyseresistentes Protein durch molekularbiologische Verfahren eingeführt werden könnte, ist fraglich. Gleichwohl konnten in dieser Arbeit auch ohne eine sinnvolle Normierung Proteine von *E. coli* identifiziert werden, die vermutlich schneller und damit bevorzugt von *B. bacteriovorus*

abgebaut werden. Gerade diese Bevorzugung bestimmter Proteine könnte Hinweise bezüglich der Auswahl und der erfolgreichen Bejagung des Wirtes liefern und somit für eine potentielle Anwendung als Antibiotikum von Bedeutung sein. Weitere Informationen bezüglich der Wirtserkennung könnten auch durch Protein-Pull-Down Analysen gewonnen werden.

4.3 Perspektiven der lanthanoidbasierten Quantifizierung

Die MeCAT-Strategie ist ein wertvolles Werkzeug für die Quantifizierung von Biomolekülen. Durch die Einführung von Metallkomplexen können die Vorteile der elementmassenspektrometrischen Verfahren für die Analyse von Proteinen genutzt werden. Die MeCAT-Strategie kann auch für eine molekularmassenspektrometrische Quantifizierung verwendet werden^[113]. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung der Markierungsreaktion konnte das Anwendungspotential der Quantifizierungsstrategie erhöht werden. Für die Analyse von komplexen biologischen Proben weist die Methode jedoch einige Nachteile auf. So ist die Methode nur begrenzt mit der Gelelektrophorese kompatibel, da die mit unterschiedlichen Metallen markierten Proteine nicht mehr komigrieren. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass mit der etablierten MeCAT-Strategie, welche auf der Markierung von Cysteinresten basiert, nur eine eher geringe Zahl an Proteinen quantifiziert wird. Die Ursache hierfür ist die geringe Häufigkeit, mit der Cystein in Proteinen vorkommt, was ursprünglich dazu genutzt wurde, die Komplexität in der ICP-MS-Analyse zu verringern. Für eine hinreichende molekularmassenspektrometrische Quantifizierung von komplexen biologischen Proben mit MeCAT wird dementsprechend eine andere Markierungsstrategie benötigt.

Hierfür bietet sich insbesondere die Aminfunktionalität an Lysinresten an. Neben der höheren Abundanz hat Lysin den Vorteil einer hohen Basizität, was sich günstig auf die Ionisierbarkeit der markierten Peptide auswirkt. Darüber hinaus wird bei einer Aminmarkierung auch der *N*-Terminus markiert, was bei einer Markierung auf Peptidebene dazu führt, dass sämtliche Peptide eine Markierung besitzen und damit für die Quantifizierung genutzt werden können. Für die Markierung von Aminfunktionen werden insbesondere NHS-Ester eingesetzt. Mithilfe eines entsprechenden MeCAT-Reagenzes konnte auch schon erfolgreich eine Quantifizierung von Modellproteinen durchgeführt werden^[103]. NHS-Ester haben allerdings den Nachteil, dass

sie im wässrigen Medium hydrolyseempfindlich sind. EL-KHATIB *et al.* konnten das Problem umgehen, indem die Modellproteine über ihre Cysteinreste an Resin lokalisiert wurden, wodurch die Markierungsreaktion im wasserarmen Medium durchgeführt werden konnte^[103]. Allerdings ist diese Vorgehensweise für die Analyse von komplexen biologischen Proben impraktikabel, einerseits aufgrund der geringen Abundanz von Cystein und andererseits aufgrund von Löslichkeitsproblemen.

Folglich ist für eine erfolgreiche Verwendung dieser Markierungsstrategie für komplexe Proben, wie *B. bacteriovorus*, zunächst eine Optimierung der Markierung im wässrigen Medium erforderlich. Da auch die ICPL-Strategie mit NHS-Estern arbeitet, sollte eine Verwendung des auf NHS-Ester basierenden MeCAT-Reagenzes im wässrigen Medium prinzipiell möglich sein. Im Zuge dieser Arbeit wurden hierzu auch schon erste Untersuchungen durchgeführt. So konnten durch eine Optimierung der Probenvorbereitung Mischungen von verschiedenen Modellproteinen erfolgreich quantifiziert werden. In Abbildung 35 sind beispielhaft die Quantifizierungsergebnisse einer Mischung aus differentiell markiertem bovinem Serumalbumin in Form eines Boxplot dargestellt.

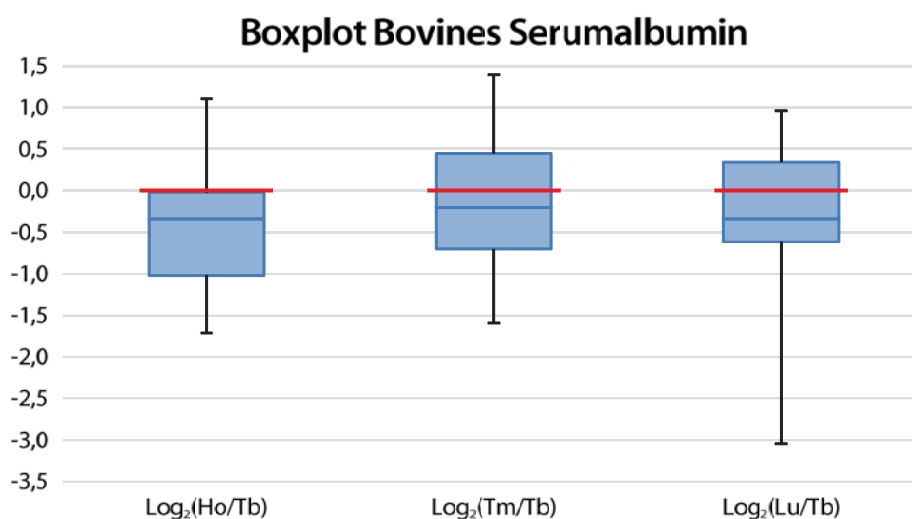


Abb. 35: Boxplotdiagramm der Quantifizierung einer Mischung aus mit terbium-, holmium-, thulium- und lutetiummarkiertem bovinem Serumalbumin. Die Proteinquantifizierung erfolgte über die Quantifizierungsverhältnisse der tryptischen Peptide. Die Daten wurden auf das Terbiumsignal normiert und logarithmisch ausgewertet. Die eingezeichneten roten Linien entsprechen jeweils dem theoretischen Verhältnis (1:1:1:1).

Die theoretischen Mischungsverhältnisse werden gut abgebildet. Nach einer entsprechenden Validierung der optimierten Markierung könnte die MeCAT-Strategie künftig auch für die molekularmassenspektrometrische Quantifizierung von komplexen biologischen Proben

genutzt werden. Gleichzeitig hätte die Methode auch den Vorteil, dass immer auch parallel eine Quantifizierung mit elementmassenspektrometrischen Verfahren erfolgen könnte.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch ein MeCAT-Reagenz mit Acrylamidfunktionalität entwickelt. Obschon das ursprüngliche Ziel, mit dem Reagenz die potentielle sterische Hinderung bei der Cysteinmarkierung zu umgehen, nicht erreicht werden konnte, konnte das Reagenz sehr erfolgreich als interner Standard für die LA-ICP-MS von Polyacrylamidgelen eingesetzt werden. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der Qualität der Ablationsbilder und der Quantifizierungsverhältnisse, beispielsweise über den Ausgleich von Oberflächeninhomogenitäten oder Kontaminationen. Weiterhin konnten variierende Analytsignale während und zwischen den Ablationsmessungen korrigiert werden. Gegenüber den etablierten Verfahren zur Normierung in der LA-ICP-MS von Polyacrylamidgelen wies der neue interne Standard diverse Vorteile auf. Im Vergleich zum Auftragen einer standardenthaltenden Schicht auf das Probenmaterial ist der neue Standard sehr tolerant gegenüber Oberflächeninhomogenitäten. Der Standard ist weiterhin deutlich empfindlicher als das ^{13}C -Signal gegenüber instrumentellen Fluktuationen und ähnelt in seinem Verhalten sehr den Analyten. Aufgrund dieser Vorteile wurde der interne Standard auch auf die komplexen *B. bacteriovorus* Proben angewendet. Auch hier führte die Anwendung zu einer Verbesserung der Signale und damit der relativen Quantifizierungsverhältnisse.

In der künftigen Forschung sollte untersucht werden, ob sich der interne Standard auch auf zweidimensionale Polyacrylamidgele anwenden lässt. Dadurch könnte sich das Anwendungsgebiet des internen Standards, gerade auch bezüglich der Analyse von komplexen Proteingemischen, deutlich erweitern. Auf diese Weise ließe sich eventuell auch der Nachteil der unterschiedlichen Migration von MeCAT-markierten Proteinen bei der Gelelektrophorese ausgleichen, indem die Proteine mit dem gleichen Metall markiert und auf unterschiedlichen Gelen getrennt werden. Mithilfe des internen Standards sollte dennoch eine relative Quantifizierung der Proben mittels LA-ICP-MS möglich sein. Auch über eine Nutzung des internen Standards für eine absolute Quantifizierung mittels LA-ICP-MS könnte nachgedacht werden. Dazu müssten aus dem LA-ICP-MS-Signal Rückschlüsse auf die Konzentration des Standards im Gel gezogen werden.

4.4 Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse

Infolge der zunehmenden Entwicklung von Antibiotikaresistenzen werden für die Behandlung multiresistenter Keime dringend Alternativen zu klassischen Antibiotika benötigt. Aufgrund seiner prädatorischen Lebensweise könnte *B. bacteriovorus* eine solche Alternative darstellen. Für einen erfolgreichen und sicheren Einsatz als Antibiotikum ist es zwingend erforderlich, die Mechanismen und Prozesse, die während des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* ablaufen, zu verstehen. So ist momentan unter anderem noch nicht geklärt, wie *B. bacteriovorus* potentielle Wirte erkennt oder warum nur gram-negative Bakterien gejagt werden. Auch im Hinblick auf eine eventuelle Pathogenität von *B. bacteriovorus* ist ein Verstehen der Lebensweise wichtig.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals über eine nicht-zielgerichtete Quantifizierung des Proteoms von *B. bacteriovorus* HD100 zu verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus untersucht. Weiterhin konnten mit der Entwicklung eines internen Standards für die LA-ICP-MS von Polyacrylamidgelen und mit der Forschung an einem MeCAT-Reagenz mit NHS-Esterfunktionalität neue Impulse für die MeCAT-Strategie angestoßen werden. Diese lassen sich eventuell auch für die künftige Analyse des Proteoms von *B. bacteriovorus* nutzen. Es konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die zu spezifischen Zeitpunkten des Lebenszyklus hoch- oder herabreguliert sind. Die größten Unterschiede im Proteinmuster treten zwischen AP und GP auf, während innerhalb der verschiedenen GP Zeitpunkte nur geringe Unterschiede im Proteinmuster existieren. Folglich konnte die bereits über Transkriptionsdaten gemachte Beobachtung, dass sich AP und GP deutlich unterscheiden, auch auf Proteinebene bestätigt werden. Da das GP-spezifische Proteom bereits 30 min nach der Penetration des Wirts beobachtet werden konnte, scheint der Wechsel zwischen AP und GP direkt nach der Penetration sehr schnell und eher schlagartig zu erfolgen.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit Transkriptionsdaten konnte festgestellt werden, dass viele Proteine, deren Gentranskription AP- bzw. GP-spezifisch ist, in diesen Phasen auch hochreguliert sind. Jedoch konnten diverse Proteine gefunden werden, deren Gentranskription GP-spezifisch ist, die jedoch in AP nicht herabreguliert bzw. teilweise sogar hochreguliert sind. Daher wurde vermutet, dass Proteine, die für die AP benötigt werden, dennoch in der GP transkribiert bzw. translatiert werden, wo infolge des Wirtes ein Substrat-

und Nährstoffüberschuss vorliegt. Für diese Vermutung spricht auch, dass in der AP einige Proteine herabreguliert sind, die mit der Proteinexpression bzw. mit der ATP-Synthese im Zusammenhang stehen. Durch die Analyse des Proteoms von *E. coli* K-12 in den verschiedenen Zeitpunkten konnte weiterhin beobachtet werden, dass *B. bacteriovorus* Proteine, die mit dem ATP-Haushalt in Verbindung stehen, vermutlich bevorzugt abbaut. Abgesehen davon scheint der Abbau der Wirtsproteine eher von der Lokalisierung und nicht von der Funktion der Proteine abzuhängen.

Durch die Analyse eines zusätzlichen Probensatzes, welcher neben AP-Zellen und Zellen 30 min bzw. 2 h nach der Penetration auch junge AP-Zellen enthielt, konnte bestätigt werden, dass sich junge AP-Zellen in ihrem Proteinmuster deutlich von regulären AP-Zellen unterscheiden. Der Lebenszyklus von *B. bacteriovorus* sollte demnach um eine weitere Phase erweitert werden. Junge AP-Zellen unterscheiden sich insbesondere darin, dass viele ribosomale und RNA-bindende Proteine herabreguliert sind. Daher wurde die These aufgestellt, dass bei jungen AP-Zellen das Ribosom noch nicht vollständig ausgebildet ist. Diese These würde auch die Vermutung unterstützen, dass viele AP-spezifische Proteine in der GP synthetisiert werden.

Die zahlreichen Ergebnisse, die in dieser Arbeit generiert wurden, liefern einen wertvollen Beitrag für die weitere Aufklärung des Lebenszyklus von *B. bacteriovorus*. Der Vergleich mit den Transkriptionsdaten hat jedoch auch gezeigt, dass es wichtig ist, nicht nur eine Art von Biomolekülen zu betrachten. Daher werden in letzter Zeit zunehmend Anstrengungen unternommen, die Analyseverfahren der verschiedenen Biomolekülarten (*Omics*) in der Multiomik zu vereinen^[134, 135]. Eine künftige Anwendung der Multiomik könnte somit helfen, die Lebensweise von *B. bacteriovorus* vollständig zu verstehen und darauf basierend eine alternative zu klassischen Antibiotika zu entwickeln.

5 Materialien und Methoden

5.1 Chemikalien

Es wurde stets entionisiertes Wasser der Qualitätsstufe Milli-Q verwendet. Stickstoff wurde mithilfe eines Stickstoffgenerators (DWT Ecoinert) generiert.

Tab. 18: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Anbieter
1,5-Naphthalindisulfonsäure Tetrahydrat (97 %)	Aldrich
2-Butanon (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol ($\geq 99,0$ %)	Fluka
2-Propanol (für LC-MS, $\geq 99,95$ %)	Chemsolute
3-Pentanon (≥ 99 %)	Aldrich
Aceton (HPLC Qualität)	Roth
Acetonitril (HPLC Ultraqualität)	J. T. Baker
Acrylamid (≥ 99 %)	Aldrich
Acrylsäure (99 %)	Aldrich
Acrylsäure- <i>N</i> -Hydroxysuccinimidester (≥ 90 %)	Aldrich
Ameisensäure (≥ 98 %)	Roth
Ammoniumformiat (97 %)	Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat (reinst)	Riedel-de Haën
Ammoniumhydroxidlösung (~ 25 %)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (≥ 98 %)	Sigma
Ammoniumsulfat ($\geq 99,5$ %)	Roth
Argon 5.0 (99,999 %)	Alphagaz 1
Bovines Serumalbumin	Sigma
Brillant Blau G250	Roth
Bromphenolblau	Fluka
Chloroform (HPLC Qualität)	J. T. Baker
Citronensäure ($\geq 99,5$ %)	Roth
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
DCC (Dicyclohexylcarbodiimid, 99 %)	Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid, $\geq 99,5$ %)	Fluka
DOTA-NHS Ester (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure mono(<i>N</i> -Hydroxysuccinimid)-ester)	CheMatech

Einzelement ICP-Standardlösung Bismut (1000 mg/L \pm 0,2 %)	Roth
Einzelement ICP-Standardlösung Praseodym (1000 mg/L \pm 0,2 %)	Roth
Einzelement ICP-Standardlösung Thulium (1000 mg/L \pm 0,2 %)	Roth
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol (absolut, \geq 99,5 %)	Chemsolute
Ethanolamin (\geq 99,0 %)	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (\geq 99 %)	Roth
Flusssäure (40 %)	Merck
Formaldehydlösung (37 % in Wasser)	Sigma-Aldrich
Glu-C (Sequenzierungsqualität)	Promega
Glycerol (\geq 99,5 %)	Sigma-Aldrich
Glycin (\geq 99 %)	Roth
Harnstoff (für Elektrophorese)	Sigma
Helium 5.0 (99,999 %)	Alphagaz 1
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, 99,5 % Pufferqualität)	Roth
Holmium(III)-chlorid Hexahydrat (\geq 99,9 %)	Aldrich
Hydroxylamin Hydrochlorid (99 %)	Alfa Aesar
ICP-Mehrelementstandardlösung XIII (Ba, B, Co, Fe, Ga, In, K, Li, Lu, Na, Rh, Sc, Ti, U, Y; 1 μ g/L)	Merck
Imidazol (>99 %)	Merck-Schuchardt
Inhibitorcocktail Bakterien	Roth
Iodacetamid	Sigma
Iodessigsäure (\geq 98 %)	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Lutetium(III)-chlorid Hexahydrat (\geq 99,9 %)	Alfa Aesar
Lysozym (von Hühnereiweis)	BioChemika
MES-Hydrat (2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure, 99,5 % Ultraqualität)	Fluka
Methanol (HPLC Ultraqualität)	J. T. Baker
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (für Elektrophorese, ~99 %)	Sigma
Natriumacetat	Fluka
Natriumazid (\geq 99,5 %, Ultraqualität)	Fluka
Natriumchlorid (\geq 99,5 %)	Roth
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (\geq 99 %)	Sigma

Natriumhydroxid ($\geq 97\%$)	Fluka
Natriumtetraborat	Sigma
Natriumthiosulfat Pentahydrat ($> 99\%$)	Fluka
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid ($\geq 97\%$)	Sigma-Aldrich
<i>ortho</i> -Phosphorsäure (reinst, 85 %)	Roth
<i>p</i> -NH ₂ -Bn-DOTA (S-2-(4-Aminobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecyltetraessigsäure)	Macrocyclics
Praseodym(III)-chlorid Hydrat ($\geq 99,9\%$)	Aldrich
Rotiphoese Gel 40; 40 % Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (37,5 : 1)	Roth
Salpetersäure (Ultraqualität, 69 %)	Roth
Salzsäure (37-38 %)	J. T. Baker
SDS (Natriumdodecylsulfat, $\geq 99,5\%$ Blottingqualität)	Roth
SERVA ICPL Quadruplex Kit	Serva
Silbernitrat	Merck
Terbium(III)-chlorid Hexahydrat (99,99 %)	Roth
Thulium(III)-chlorid (wasserfrei, 99,9 %)	Aldrich
Tricin (<i>N</i> -(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin, $\geq 99\%$)	Roth
Triethylamin ($\geq 99,5\%$)	Roth
Triethylammoniumbicarbonatpuffer (1 M für HPLC, pH 8,4-8,6)	Honeywell/Fluka
Trifluoressigsäure ($\geq 99,9\%$)	Roth
Trimethylaminlösung (~45 % in Wasser)	Fluka
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99,9\%$)	Roth
TRIS Hydrochlorid (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol Hydrochlorid)	Boehringer Mannheim
Tris(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid ($\geq 98\%$)	Sigma
Triton X-100 Lösung (Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether, Ultraqualität)	Fluka
Trypsin (modifiziert, Sequenzierungsqualität)	Promega
Wasserstoffperoxidlösung (30 %)	Roth
Yttrium(III)-carbonat Hydrat (99,99 %)	Roth
α -Lactalbumin (bovine Milch)	Sigma

5.2 Methoden

Synthese von MeCAT-Reagenzien

Die Synthese erfolgte nach SCHWARZ *et al.* ^[113]. Für die Synthese von MeCAT-IA wurde zunächst *N*-Succinimidylodacetat nach ^[136] hergestellt. Einwaagen erfolgten an einer CP225D Analysenwaage (Sartorius). Zunächst wurden 2,63 g (14,132 mmol) Iodessigsäure und 1,63 g (14,132 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 400 ml Ethylacetat gelöst. Zur Lösung wurde 2,92 g (14,132 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Anschließend wurde über Nacht gerührt. Der *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockene unter Vakuum eingengt. Der Rückstand, ein gelblicher Feststoff, wurde mit Ethanol umkristallisiert. Nach Trocknung auf Tonplatten wurden 3,34 g (Ausbeute: 83 %) eines weißen, kristallinen Feststoffes erhalten.

Anschließend wurden 5 mg (10 µmol) *S*-2-(4-Aminobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-tetraessigsäure (DOTA-Bn-NH₂) in 100 µL 0,6 M Natriumhydrogencarbonatlösung und 6 mg (32 µmol) *N*-Succinimidylodacetat in 100 µL Aceton gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde mindestens zwei Stunden bei -78°C eingefroren und etwa eine Stunde an der Vakuumzentrifuge SpeedVac AES 1000 (Savant Instruments) getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde ein weißer bis hellgelber Feststoff erhalten, welcher ohne weitere Arbeitsschritte für die Metallierungsreaktion verwendet wurde. Zur Metallierung wurden etwa 3 eq. (37 µmol) Lanthanoidsalz in 0,5 ml 110 mM Natriumacetatlösung gelöst und zum getrockneten Produkt der vorherigen Reaktion gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Aufreinigung des metallierten Komplexes erfolgte mittels präparativer HPLC (Thermo Separation Products) mit einer BioBasic C18-Säule (5 µm; 250 x 21,2 mm; Thermo Scientific). Als Eluenten wurden Gemische bestehend aus Methanol, Wasser und Trifluoressigsäure (TFA) genutzt (A: 5 % Methanol, 0,1 % TFA und 94,9 % Wasser (v/v/v), B: 10 % Wasser, 0,1 % TFA und 89,9 % Methanol (v/v/v)). Für die Trennung wurde ein 45min-Gradient, beginnend mit einer isokratischen Stufe von 82 % A und 18 % B und anschließendem Spülschritt von 95 % B und 5 % A bei einer Flussrate von 5 ml/min eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption bei 280 nm. Mittels Fraktionssammler wurden Fraktionen zu je 1 Minute gesammelt, gefroren und anschließend gefriergetrocknet (Alpha 1-4, Christ). Ein Teil der relevanten Fraktionen zur

Qualitätssicherung in einem Gemisch aus 49,9 % Wasser, 50 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure (FA) (v/v/v) gelöst und mittels ESI-MS analysiert.

Die Synthese des MeCAT-Reagenzes mit Acrylamidfunktionalität erfolgte analog zur MeCAT-IA-Synthese. 5 mg (10 µmol) DOTA-Bn-NH₂ wurden in 100 µL 0,6 M Natriumhydrogencarbonatlösung vorgelegt und mit 5,41 mg (32 µmol) Acrylsäure-N-Hydroxysuccinimidester in 100 µL Aceton versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend für 2 h bei -78°C eingefroren und an der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Metallierung und die Aufreinigung des Reagenzes mittels HPLC waren identisch zur Metallierung und Aufreinigung von MeCAT-IA.

Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinproben mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE wurden 12 %ige Trenngele verwendet. Zur Herstellung der Trenngele wurden 8,7 mL Wasser, 5 mL Trenngelpuffer (1,5 M TRIS, pH 8,8, eingestellt mit HCl), 6 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1, 40 %ige Lösung), 200 µL SDS-Lösung (10 % SDS), 80 µL APS-Lösung (10 % APS) und 20 µL TEMED gemischt und zwischen zwei Glasplatten auspolymerisiert. Für die Sammelgele wurden 7,25 mL Wasser mit 1,25 mL Sammelgelpuffer (1 M TRIS, pH 6,8, eingestellt mit HCl), 1,25 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1, 40 %ige Lösung), 100 µL SDS-Lösung (10 % SDS), 60 µL APS-Lösung (10 % APS) und 20 µL TEMED gemischt und ebenfalls zwischen den Glasplatten auspolymerisiert. Die getrockneten Proteinproben wurden in der Regel in 15 µL Wasser gelöst und mit 5 µL Ladepuffer (0,125 M Tris-HCl, 4 % SDS, 6 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,004 % Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt. Bei Modellproteinen wurden in der Regel 1 bis 2 µg Protein eingesetzt und die gelösten Proben für ca. 5 min bei 95°C erhitzt. Bei den *B. bacteriovorus* Proben wurden 40 µg eingesetzt, wobei das Lösemittel zur besseren Löslichkeit 6 M Harnstoff enthielt und die gelösten Proben für ca. 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde Roti Mark Standard auf das Gel aufgetragen. Für die Gelelektrophorese wurde ein Mini-POTEA Set (Bio-Rad) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einem Laufpuffer (25 mM TRIS, 250 mM Glycin, 0,01 % SDS) bei 50 mA für etwa 1 h durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele über Nacht mit Coomassielösung (380 mM H₃PO₄, 1,28 M Ammoniumsulfat, 0,66 % Brillant Blau G-250 oder R-250, 34 % (v/v) MeOH) gefärbt und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfärbt.

Die jeweiligen Gelbanden wurden ausgeschnitten, in Stücke zerschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Hier wurden die Gelstücke mehrmals mit einer 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (ABC)-Lösung (50 % (v/v) Acetonitril) gewaschen, wodurch eine Entfärbung der Banden einsetzte. Anschließend wurden die Gelstücke durch Waschen mit reinem Acetonitril (ACN) geschrumpft. Zum Verdampfen der ACN-Reste wurden die Gelstücke anschließend 10 min an Luft getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden mit 30 µL einer 50 mM ABC-Lösung versetzt, wobei die Lösung Trypsin im Verhältnis 1:40 zum Protein enthielt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die nun aufgequollenen Gelstücke wurden vollständig mit 50 mM ABC-Lösung bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Lösemittelüberstand wurde gesammelt und die Gelstücke mehrmals mit 25 mM ABC-Lösung (50 Vol.-% ACN) extrahiert. Anschließend wurden die Gelstücke erneut mit reinem ACN geschrumpft und das überstehende ACN aufgefangen. Die aufgefangenen Überstände wurden vereinigt und an der Vakuumzentrifuge eingeeengt. Bei aminmarkierten Proteinen wurden die Gelstücke anschließend erneut für 10 min an Luft getrocknet. Sowohl die Gelstücke als auch die getrockneten Extrakte wurden anschließend mit 30 µL 50 mM ABC-Lösung versetzt, die jeweils Glu-C im Verhältnis 1:50 (insgesamt folglich 1:25) enthielt. Die aufgequollenen Gelstücke wurden vollständig mit 50 mM ABC-Lösung bedeckt und zusammen mit den Extrakten über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Lösemittelüberstand über den Gelstücken wurde gesammelt und die Gelstücke mehrmals mit 25 mM ABC-Lösung (50 % (v/v) ACN) extrahiert. Anschließend wurden die Gelstücke erneut mit reinem ACN geschrumpft und das überstehende ACN aufgefangen. Die aufgefangenen Überstände wurden mit den Trypsinextrakten vereinigt und an der Vakuumzentrifuge eingeeengt.

SCX

Vor der Fraktionierung mittels SCX wurden die Peptidproben zunächst mithilfe von C18-Makrospincolumns (The Nest Group) aufgereinigt. Dafür wurden die Lösemittelgemische A (ACN, 0,5 % TFA (v/v)), B (Wasser, 0,5 % TFA (v/v)) und C (18 % Wasser, 80 % ACN, 2 % TFA (v/v/v)) hergestellt. Das Abzentrifugieren der Lösemittel von der Säule erfolgte jeweils für 1 min bei 800 rpm an einer SIGMA 3K30 Zentrifuge (Sigma). Zur Konditionierung wurde die Säule mit 400 µL A versetzt und abzentrifugiert, anschließend zweimal mit 400 µL B versetzt und jeweils abzentrifugiert. Zur Beladung der Säule wurden zwischen 100 und 150 µg Peptide (Gesamtkapazität 300 µg), die in bis zu 200 µL wässrigem Lösemittel gelöst waren, 1 zu 1 mit

B verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde anschließend auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Das Eluat wurde nochmals auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Je nach Salzkonzentration in der ursprünglichen Peptidprobe, wurde die Säule zwei- bis viermal mit 150 µL B gewaschen und jeweils abzentrifugiert. Zur Elution der Peptide wurde die Säule dreimal mit 150 µL C versetzt und jeweils abzentrifugiert. Die Eluate wurden vereinigt und an der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für die SCX-Fraktionierung wurde die getrocknete Peptidprobe je 100 µg Peptid in 100 µL Lösemittel (79,5 % Wasser, 20 % ACN, 0,5 % FA (v/v/v)) gelöst. Die Fraktionierung der Probe erfolgte an einem Agilent 1100er HPLC-System (Agilent Technologies) mit einer PolySulfoethyl ATM-Säule (5 µm; 200 Å; 200 x 21 mm, PolyLC INC.). Es wurden jeweils 100 µL Probe injiziert. Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 0,200 mL/min. Für die Trennungen mit Kaliumchlorid wurden Gradienten der Eluenten A (74,95 % Wasser, 25 % ACN, 0,05 % FA (v/v/v)) und B (500 mM Kaliumchlorid, 74,95 % Wasser, 25 % ACN, 0,05 % FA (v/v/v)) verwendet. In Tabelle 19 sind die für die Trennung verwendeten Gradienten aufgelistet. Der linke Gradient wurde für das erste Replikat des ersten Probensatzes verwendet, der rechte Gradient mit verbesserter Trennleistung für die restlichen Replikate. Die Fraktionen wurden in Schritten von 1 min aufgefangen und an einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Tab. 19: Für die SCX-Fraktionierung des ersten Probensatzes von *B. bacteriovorus* verwendete Gradienten. Der linke Gradient wurde für das erste Replikat des ersten Probensatzes verwendet, der rechte Gradient für die restlichen Replikate. Als Fraktionierungssalz wurde Kaliumchlorid verwendet.

Gradient1		Gradient2	
t [min]	B [%]	t [min]	B [%]
0	0	0	0
5	0	3	0
45	100	4	10
50	100	44	75
55	0	45	100
65	0	50	100
		55	0
		65	0

Für die Gradientenoptimierung der SCX mit Ammoniumformiat wurden jeweils 100 µg mit Trypsin proteolysiertes bovines Serumalbumin gelöst in 100 µL Lösemittel (79,5 % Wasser, 20 % ACN, 0,5 % FA (v/v/v)) verwendet. Die SCX-Fraktionierung der Probe erfolgte an einem Agilent 1100er HPLC-System (Agilent Technologies) mit einer PolySulfoethyl ATM-Säule (5 µm; 200 Å; 200 x 21 mm, PolyLC INC.). Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 0,200 mL/min. Es wurden Gradienten aus A (75 % Wasser, 25 % ACN (v/v), 10 mM Ammoniumformiat, pH 3,0) und B (75 % Wasser, 25 % ACN (v/v), 500 mM Ammoniumformiat, pH 6,8) verwendet, wobei der pH-Wert mit FA eingestellt wurde. Für die Optimierung wurden sechs Gradienten getestet. In Tabelle 20 sind die Gradienten aufgelistet. Der erste Gradient, welcher als Ausgangspunkt für die Optimierung verwendet wurde, wurde von WANG *et al.* genutzt, um das Proteom von menschlichen MCF10A Zellen aufzutrennen^[74]

Tab. 20: Für die Optimierung verwendete Gradienten.

Gradient1		Gradient2		Gradient 3		Gradient 4		Gradient 5	
t [min]	B [%]	t [min]	B [%]	t [min]	B [%]	t [min]	B [%]	t [min]	B [%]
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
60	50	20	10	15	5	14	4	13	3
70	100	100	50	55	15	62	10	41	10
75	100	110	100	65	20	82	15	51	15
75,01	0	115	100	95	50	107	40	76	40
85	0	115,01	0	100	100	110	100	80	100
		125	0	110	100	120	100	90	100
				110,01	0	120,01	0	90,01	0
				120	0	130	0	100	0

In Abbildung 36 sind die Trennleistungen der verschiedenen Gradienten gegenübergestellt.

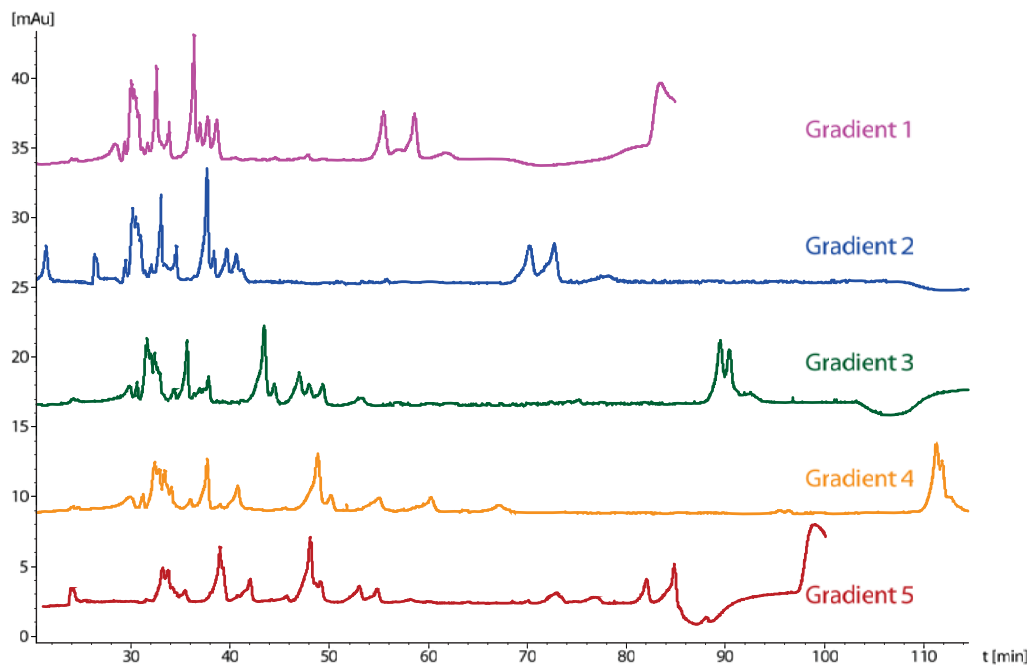


Abb. 36: Optimierung der SCX-Fraktionierung mit Ammoniumformiat an bovinem Serumalbumin. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 280 nm. Der für die untere Trennung verwendete Gradient wurde als Optimum auch für die Fraktionierung der *B. bacteriovorus* Proben verwendet. Die Bezeichnungen entsprechen den Bezeichnungen in Tabelle 20.

Gradient 5 wurde als Gradient mit der besten Trennleistung angesehen und für die Trennung der Replikate des zweiten Probensatzes von *B. bacteriovorus* verwendet. Die restlichen Parameter der Fraktionierung waren identisch zur Fraktionierung des ersten Probensatzes.

Lyseoptimierung an *E. coli*

Für die Lyseoptimierung wurden Reste einer *E. coli* K-12 Probe der Charité Berlin genutzt. Es wurden stets 5 μ L Zellen mit 14 μ L Wasser, 1 μ L Inhibitorcocktail (Carl Roth) und 80 μ L Lysepuffer gemischt, sodass sich eine Pufferendkonzentration von 50 mM ergab. Weitere Informationen bezüglich der einzelnen Ansätze sind in Tabelle 21 aufgelistet. Die Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentrationen der Lysemischung. Sämtliche Lysepuffer enthielten 50 mM Natriumchlorid und 5 mM EDTA. pH-Werte wurden mit 1 M Natronlauge bzw. 1 M Salzsäure eingestellt. Die Überprüfung erfolgte an einem pH-Meter (inoLab pH Level 1, WTW).

Tab. 21: Experimentelle Lyseparameter für *E. coli* K-12.

Puffer (50 mM)	pH-Wert	Additive	Lysemethode
Natriumacetat	5,0	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Natriumacetat	5,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
MES	6,0	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
MES	6,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
TRIS	7,0	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
TRIS	7,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
TRIS	8,0	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
TRIS	8,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
TRIS	9,0	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Phosphat	7,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Imidazol	7,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
HEPES	7,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Tricin	7,5	Lysozym (1 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Phosphat	7,5	/	<i>Freeze-Thaw</i>
Phosphat	7,5	/	Erwärmen
Phosphat	7,5	/	Ultraschall
Phosphat	7,5	Lysozym (1 mg/mL) Triton X-100 (2 mg/mL)	Schütteln
Phosphat	7,5	Triton X-100 (2 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Phosphat	7,5	Triton X-100 (2 mg/mL)	Ultraschall
Phosphat	7,5	SDS (2 mg/mL)	<i>Freeze-Thaw</i>
Phosphat	7,5	SDS (2 mg/mL)	Ultraschall

Bei der *Freeze-Thaw*-Lyse wurde die Probe 10 min bei -80°C eingefroren und 5 min bei 37°C aufgetaut und anschließend gründlich durchmischt. Dieser Ablauf wurde viermal durchgeführt. Bei der Ultraschalllyse wurde die Probe 40-mal abwechselnd für jeweils 2 s bei 37 kHz in ein Ultraschallbad (Elmasonic S15H, Elma) und ein Eisbad gehalten. Nach 20 Durchgängen und am Ende wurde die Probe gründlich durchmischt. Beim Erwärmen wurde die Probe 1 h bei 99°C erwärmt. Beim Schütteln wurde die Probe 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Für den Lyseoptimierungsschritt an *B. bacteriovorus* wurde immer jeweils ein Ansatz an HD100 und an PI (Daten nicht gezeigt) durchgeführt. Die Zellen wurden vom Kooperationspartner an der *Hebrew-University of Jerusalem* zur Verfügung gestellt. Sämtliche Ansätze wurden mit der oben beschriebenen *Freeze-Thaw*-Lyse und den Additiven 50 mM Natriumchlorid, 5 mM EDTA und 2 mg/mL SDS durchgeführt. In Tabelle 22 sind weitere Informationen bezüglich der Ansätze aufgelistet.

Tab. 22: Experimentellen Lyseparameter von *B. bacteriovorus* HD100 und PI.

Puffer (50 mM)	pH-Wert
Phosphat	7,0
Phosphat	8,0
Phosphat	7,5
TRIS	7,5
HEPES	7,5

Optimierung der MeCAT-Reaktion

Die Optimierung wurde am Modellprotein α -Lactalbumin durchgeführt. Bei vier Ansätzen wurde zusätzlich bovines Serumalbumin verwendet (Vgl. Tab. 23), wobei die Prozessierung und Analyse analog zu α -Lactalbumin durchgeführt wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurde so gearbeitet, dass das Protein in der Markierungsreaktion 25 μ M konzentriert war. Zunächst wurde das Protein mit 1,5 eq. TCEP pro Cysteinrest für 30 min bei 50°C reduziert. Anschließend wurden die Proben jeweils mit 3 eq. Ho-MeCAT-IA pro Cysteinrest markiert, indem sie 2 h bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert wurden. Die Aufreinigung mittels Gelelektrophorese, das Färben und Entfärben der Gele und die Trypsinproteolyse (in den Fällen, dass diese durchgeführt wurde) erfolgten wie im Kapitel „Gelelektrophorese“ beschrieben. Die jeweiligen in den Markierungsreaktionen genutzten Parameter sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tab. 23: Parameter für die Markierungsreaktion. ¹Es handelt sich um das Referenzsystem. ²Bei diesen Parametern wurden auch Experimente mit bovinem Serumalbumin durchgeführt und die proteolysierten Proben mittels nanoLC-MS analysiert. ³Dieser Ansatz wurde über HPLC-MS analysiert.

Puffer	pH-Wert	Additive
Borat	8,3	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff ^{1,2}
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff
TRIS	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff ³
HEPES	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff
Phosphat	6,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff
Phosphat	6,5	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff
Phosphat	7,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff
Phosphat	7,5	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff 1 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff 0,2 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff 0,01 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff 1 % (w/v) Triton X-100
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff 0,2 % (w/v) Triton X-100
Phosphat	8,0	20 % (v/v) Aceton, 4 M Harnstoff 0,01 % (w/v) Triton X-100
Phosphat	8,0	0,2 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	0,05 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	20 % (v/v) 2-Butanon
Phosphat	8,0	20 % (v/v) 3-Pentanon
Phosphat	8,0	1 % (w/v) SDS ²
Phosphat	8,0	2 % (w/v) SDS ²
Phosphat	8,0	20 % (v/v) 2-Butanon 0,2 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	20 % (v/v) 3-Pentanon 0,2 % (w/v) SDS
Phosphat	8,0	4 M Harnstoff 0,2 % (w/v) SDS ²
Phosphat	8,0	0,2 % (w/v) Triton X-100

Ein Ansatz wurde zusätzlich zur gelelektrophoretischen Auftrennung mittels HPLC-MS analysiert (Vgl. Tab. 23). Als Vergleich wurde eine unmarkierte Probe von α -Lactalbumin hergestellt, die genauso wie die markierte Probe prozessiert wurde außer, dass kein Ho-MeCAT-IA zugegeben wurde. Beide Proben wurden mit 0,1 % FA auf 20 μ M verdünnt und an einem Agilent 1200 HPLC-System (Agilent Technologies) aufgetrennt und über eine ESI-Quelle (Spannung 4,5 kV, Gasfluss (N_2) 35 arb; Thermo Fisher Scientific) an ein LTQ-FTICR Ultra (Kapillartemperatur 230°C, Kapillarspannung 22 V, Thermo Fisher Scientific) gekoppelt. Es

wurden jeweils 5 µL Probe injiziert. Die Trennung erfolgte an einer C₃-Säule (Zorbax 300SB-C₃, 2,1 x 12,5 mm, 5 µm, Agilent Technologies) bei einem Fluss von 15 µL/min mit dem in Tabelle 24 beschriebenen Gradienten aus Eluent A (94,9 % Wasser, 5 % ACN, 0,1 % FA) und Eluent B (99,9 % ACN, 0,1 % FA) (jeweils v/v/v).

Tab. 24: 35 min HPLC-Gradient für die nicht-proteolysierten Proben.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	10
20	50
22	95
28	95
30	10
35	10

Bei den Ansätzen, die proteolysiert wurden, wurden die getrockneten Proben in so viel 0,1 % FA gelöst, dass sich eine Proteinkonzentration von 0,5 µM ergibt. Die Trennung mittels nanoLC-MS und die Analyse mittels FTMS erfolgten wie im Kapitel „Anwendung von MeCAT-IA auf die *B. bacteriovorus* Proben“ beschrieben. Dabei wurden jeweils 2 µL injiziert. Es wurde ein 35 min-Gradient verwendet (Tab. 25)

Tab. 25: 35 min-HPLC-Gradient für die proteolysierten Proben.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	10
5	10
25	40
26	90
30	90
31	10
35	10

Lyse der *B. bacteriovorus* Proben

Die *B. bacteriovorus* Proben von verschiedenen Zeitpunkten des Lebenszyklus wurden vom Kooperationspartner der Arbeitsgruppe um JURKEVITCH von der *Hebrew-University of Jerusalem* zur Verfügung gestellt. Die GP-Zellen wurden in 25 mM HEPES (pH 7,4) kultiviert und synchronisiert. Den AP- und *E. coli* Zellen wurde für die Kultivierung zusätzlich 3 mM Magnesiumchlorid und 2 mM Calciumchlorid zugesetzt. Die Proben wurden an einer Hochleistungszentrifuge pelletiert und sofort bei -80°C eingefroren. Den Proben wurden jeweils 0,1 % (w/v) Natriumazid und Protease Inhibitor cOmplete (Sigma-Aldrich) zugesetzt

und die Proben mit Trockeneis nach Berlin versandt. Hier wurde den Proben jeweils 1280 μL Lysepuffer (62,5 mM TRIS; 62,5 mM Natriumchlorid; 6,25 mM EDTA; pH 8,0), 32 μL SDS (100 mg/mL) und 16 μL Protease Inhibitor (Carl Roth) zugesetzt und die Proben mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1600 μL aufgefüllt. Die Proben mit 7 *Freeze-Thaw*-Zyklen lysiert. Jeder Zyklus umfasste 20 min Einfrieren bei -80°C und 10 min Auftauen bei 37°C . Zwischen den Zyklen wurden die Proben gründlich durchmischt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 23.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen und an der Vakuumzentrifuge eingeeengt.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford^[137] wurden die Proben zunächst über eine Acetonfällung entsalzt. Dazu wurden die eingeeengten Proben in 300 μL Wasser gelöst und mit 1500 μL -20°C Aceton (fünffacher Überschuss) versetzt. Die Proben wurden gründlich durchmischt und bei -20°C über Nacht gelagert. Die Proben wurden bei 4°C für 30 min bei 20.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Waschen wurden die Pellets mit 200 μL -20°C Waschlösung (20 % Wasser, 80 % Aceton) versetzt, kurz geschwenkt und bei 4°C für 5 min bei 20.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets 10 min an Luft getrocknet. Für das Bradford-Assay wurden die Proben in jeweils 50 μL ICPL-Lysepuffer gelöst. Jeweils 1 μL der Proben wurden mit 9 μL ICPL-Lysepuffer und 190 μL Bradfordlösung (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Coomassie G250; 0,5 % Ethanol; 1 % Phosphorsäure; 98,5 % Wasser (v/v/v) in Mikrotiterplatten abgefüllt und photometrisch bei 620 nm an einem Mikroplattenleser bestimmt. Die Kalibration erfolgte mit bovinem Serumalbumin in den Konzentrationen 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Blindwert), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sämtliche Proben wurden dreimal bestimmt. Anschließend wurde auf die Konzentration der Ursprungsproben zurückgerechnet und die Proben jeweils mit ICPL-Lysepuffer auf eine Endkonzentration von 5 mg/mL eingestellt.

Anwendung von MeCAT-IA auf die *B. bacteriovorus* Proben

Jeweils 2 μL der *B. bacteriovorus* Probe wurden mit 7 μL Wasser und 0,6 μL TCEP (50 mM) versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Für die Markierung wurden die Proben mit 20 μL Puffer (200 mM TRIS, 8 M Harnstoff, pH 8,0, eingestellt mit Salzsäure), 0,8 μL SDS (100 mg/mL) und 9,6 μL Ln-MeCAT-IA (20 mM, Ln = Tb, Ho, Tm, Lu) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die vier Proben (AP; 1 h, 2 h, 3 h nach

Penetration) wurden anschließend im 1:1:1:1-Verhältnis (v/v/v/v) gemischt und über eine Chloroform/Methanol-Fällung aufgereinigt. Dazu wurde die Mischung (140 µL) mit 560 µL MeOH, 140 µL Chloroform und 420 µL Wasser versetzt. Zwischen den Zugaben wurde die Probe jeweils durchmischt. Die Probe wurde 1 min bei 23.000 rpm zentrifugiert und die Obere der zwei Phasen verworfen. Es wurden wieder 560 µL Methanol zugegeben und die Probe durchmischt und bei 5 min bei 23.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand kurz an der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrocknete Probe wurde aufgenommen in 30 µL Wasser und 10 µL Ladepuffer (Vgl. Gelelektrophorese). 16 µL wurden auf ein Polyacrylamidgel gegeben und die Gelelektrophorese direkt nach dem Erreichen des Trenngels gestoppt. Die Prozessierung (Färben, Entfärben, Proteolyse) der Gelbande erfolgte wie im Kapitel „Gelelektrophorese“ beschrieben. Es wurde die gesamte Bande ausgeschnitten und mit Trypsin proteolysiert.

Die an der Vakuumzentrifuge getrocknete Probe wurde in 25 µL Lösemittel (94,9 % Wasser, 5 % ACN, 0,1 % FA (v/v/v)) aufgenommen. Für die Analyse wurde die Probe an einem 1100er HPLC System (Agilent Technologies) aufgetrennt, welches über eine nanoESI-Quelle (Spannung 2,4 kV, Eigenbau) an ein FTMS (LTQ-FTICR Ultra; Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war. Es wurde 1 µL Probe injiziert. Über die binäre Pumpe wurde die Probe mit dem Eluent C (97,4 % Wasser, 2,5 % ACN, 0,1 % FA (v/v/v)) bei einem Fluss von 0,02 mL/min auf die Vorsäule (Zorbax 300SB-C18, 5 µm, 5 x 0,3 mm; Agilent Technologies) geladen. Die Trennung über die Säule (Zorbax 300SB-C18, 3,5 µm, 150 mm x 75 µm; Agilent Technologies) erfolgte durch einen 480 min Gradienten der Eluenten A (94,9 % Wasser, 5 % ACN, 0,1 % FA (v/v/v)) und B (99,9 % ACN, 0,1 % FA (v/v/v)) bei einem Fluss von 0,35 µL/min. Der Gradient ist in Tabelle 26 angegeben.

Tab. 26: 480 min nanoLC-Gradient.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	10
5	10
440	40
460	60
463	90
473	90
476	10
480	10

Die massenspektrometrische erfolgte bei einer Kapillartemperatur von 200°C und einer Kapillarspannung von 33 V. Die CID-Fragmentierung wurde bei 35 % normierter Energie, wobei jeweils die zehn intensivsten Signale eines Übersichtspektrums fragmentiert wurden.

ICPL-Markierung der *B. bacteriovorus* Proben auf Proteinebene

Die ICPL-Markierung der *B. bacteriovorus* Proben erfolgte nach dem Protokoll des ICPL Quadruplex Kits (SERVA). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte dabei prinzipiell mit 2 N Natronlauge bzw. Salzsäure. Jeweils 20 µL (100 µg) der Proteinprobe (Vgl. Kapitel „Lyse der *B. bacteriovorus* Proben“) wurden in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Beim zweiten Probensatz wurden jeweils 10 µL der AP-Probe mit 10 µL der *E. coli* K-12 Probe gemischt. Es wurde jeweils 0,5 µL Reduktionslösung hinzugegeben und die Proben für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 0,5 µL Alkylierungsreagenz versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Zum Stoppen der Alkylierung wurden die Proben mit 0,5 µL Stopplösung 1 versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben wurden differentiell mit den ICPL-Reagenzien (ICPL_0, ICPL_4, ICPL_6, ICPL_10) markiert, wobei jeweils 3 µL ICPL-Reagenz zu den Proben gegeben wurde. Die Proben wurden in eine Argonatmosphäre getan, um Oxidation zu vermeiden. Zur besseren Durchmischung wurden die Proben für 1 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Proben für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils 2 µL Stopplösung 2 zugegeben und die Proben für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweils vier Proben eines Ansatzes wurden anschließend vereinigt (Proteingehalt ca. 400 µg). Zur Esterhydrolyse wurde der pH-Wert der Mischungen auf mit 2 N Natronlauge auf 11,9 eingestellt und die Proben für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Neutralisierung mit 2 N Salzsäure. Die Proben wurden über eine Acetonfällung, wie im Kapitel „Lyse der *B. bacteriovorus* Proben“ beschrieben, entsalzt, wobei die Proben anschließend zur besseren Löslichkeit in 6 M Harnstoff aufgenommen wurden. Die darauffolgende Gelelektrophorese und Proteolyse durch Trypsin und Glu-C erfolgte, wie im Kapitel „Gelelektrophorese“ beschrieben. Die getrockneten extrahierten Gelfractionen wurden jeweils in 50 µL Lösemittel (94,9 % Wasser, 5 % ACN, 0,1 % FA) aufgenommen und in Mikrotiterplatten überführt. Die Trennung der Proben mittels nanoLC-MS und die Analyse mittels FTMS (LTQ-FTICR-Ultra,

Thermo Fisher Scientific) erfolgten wie im Kapitel „Anwendung von MeCAT-IA auf die *B. bacteriovorus* Proben“ beschrieben. Dabei wurden jeweils 30 µL Probe injiziert und mit einem 120 min Gradienten getrennt (Vgl. Tab. 27).

Tab. 27: 120 min nanoLC-Gradient.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0,0	5
5,0	5
95,0	25
105,0	40
110,0	90
114,5	90
115,0	5
120,0	5

ICPL-Markierung der *B. bacteriovorus* Proben auf Peptidebene

Die ICPL-Markierung der *B. bacteriovorus* Proben auf Peptidebene erfolgte nach einem Protokoll des ICPL Plus Kits (SERVA). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte jeweils durch 2 n Natronlauge bzw. Salzsäure. Jeweils 20 µL (100 µg) Probe wurden mithilfe einer Acetonfällung entsalzt. Beim zweiten Probensatz wurden jeweils 10 µL der AP-Probe mit 10 µL der *E. coli* K-12 Probe gemischt. Für die Acetonfällung wurden die Proben mit 60 µL Wasser verdünnt und die Proben, wie im Kapitel „Lyse der *B. bacteriovorus* Proben“ beschrieben, prozessiert. Die getrockneten Proben wurden in jeweils 40 µL 0,1 M Triethylammoniumbicarbonatpuffer (pH 8,5) aufgenommen und es wurden jeweils 1 µL Reduktionslösung hinzugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µL Alkylierungsreagenz zu den Proben gegeben und die Proben für 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Zum Stoppen der Alkylierung wurden die Proben mit 1 µL Stopplösung 1 versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend mithilfe von Trypsin proteolysiert. Dazu wurden die Proben auf pH 8,3 eingestellt. Anschließend wurde 1 µL (0,5 µg) im Puffer gelöstes Trypsin zu den Proben gegeben und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde nochmals 1 µL (0,5 µg) Trypsin zu den Proben gegeben (Gesamtverhältnis Trypsin zu Probe 1:100) und diese für 2 h bei 37°C inkubiert.

Die proteolysierten Proben wurden differentiell mit ICPL markiert. Dazu wurde der pH-Wert der Proben auf 8,3 eingestellt und es wurden jeweils 6 µL ICPL-Lösung zu den Proben gegeben. Die Proben wurden in eine Argonatmosphäre getan und 1 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Proben für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden mit 4 µL Stopplösung 2 versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden vereint (Gesamtproteingehalt ca. 400 µg) und der pH-Wert Mischung für 20 min auf 11,9 eingestellt. Anschließend wurde mit 2 N Salzsäure ins leicht Saure neutralisiert. Die Aufreinigung der Proben durch Makrospincolumns und die Fraktionierung mittels SCX erfolgten wie im Kapitel „SCX“ beschrieben. Es wurde etwa ein Drittel (ca. 120 µg) der Proben auf die Makrospincolumns gegeben. Die getrockneten SCX-Fraktionen wurden in jeweils 100 µL Lösemittel (79,5 % Wasser, 20 % ACN, 0,5 % FA (v/v/v)) aufgenommen. Bei jenen Proben, die mit Kaliumchlorid fraktioniert wurden, wurden die Proben zunächst noch einmal mit Makrospincolumns, wie im Kapitel „SCX“ beschrieben, entsalzt. Die anschließende Trennung (einschließlich des Gradienten) und Analyse mittels nanoLC-MS und FTMS erfolgte wie im Kapitel „ICPL-Markierung der *B. bacteriovorus* Proben auf Proteinebene“ beschrieben, wobei ein LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) MS verwendet wurde. Die NanoESI-Quelle arbeitete bei einer Spannung von 1,7 kV und die Transferkapillare hatte eine Temperatur von 200°C und eine Spannung von 15 V.

Proteinmarkierung durch MeCAT mit NHS-Esterfunktionalität

Bei den Experimenten zu MeCAT mit NHS-Esterreaktivität Ansätzen erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit 2 N Natronlauge bzw. Salzsäure. Es wurde Proteinmischung aus Modellproteinen hergestellt (Tab. 28) und die Proben jeweils im Verhältnis 3:2 mit ICPL-Lysepuffer versetzt. Anschließend erfolgte eine Acetonfällung, wie im Kapitel „Lyse der *B. bacteriovorus* Proben“ beschrieben, wobei die Proben mit 60 µL Wasser verdünnt wurden. Die getrockneten Proben wurden in 40 µL 50 mM HEPES-Puffer (pH 8,5) gelöst, mit jeweils 1 µL ICPL-Reduktionslösung versetzt und für 45 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 µL ICPL-Alkylierungsreagenz versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Es wurde 1 µL ICPL-Stopplösung 1 zu den Proben gegeben und die Proben für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert der Proben wurde auf 8,3 eingestellt und die Proben wurden mit 2 µL (1 µg) Trypsin versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde weiteres 1 µL (0,5 µg) Trypsin zu den Proben

gegeben (Gesamtverhältnis Trypsin zu Probe 1:40) und die Proben für weitere 2 h bei 37°C inkubiert.

Tab. 28: Proteinmengen und -verhältnisse der vier Modellproteinmischungen. In den Klammern ist jeweils das verwendete Metall für die MeCAT-Markierung aufgelistet.

	Mischung 1 (Tb)	Mischung 2 (Ho)	Mischung 3 (Tm)	Mischung 4 (Lu)	Theoretisches Verhältnis
Bovines Serumalbumin	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	1/1/1/1
α-Lactalbumin	24 µg	12 µg	6 µg	24 µg	4/2/1/4
Lysozym	8 µg	24 µg	16 µg	8 µg	1/3/2/1

Für die Markierung mit MeCAT mit NHS-Esterreaktivität wurden die Proben mit 50 µL ACN und 50 µL 1 M HEPES-Puffer (pH 8,5) verdünnt und mit jeweils 6 µL 0,3 M DOTA-NHS gelöst in Dimethylsulfoxid versetzt. Die Proben wurden 1 min mit Ultraschall behandelt, der pH-Wert auf 8,5 eingestellt und die Proben für 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Abbruch der Reaktion wurden die Proben mit 4 µL 2,2 M Hydroxylammoniumchlorid versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die differentielle Metallierung des DOTA wurden die Proben mit 180 µL 50 mM Lanthanoidchloridlösung (Ln = Tb, Ho, Tm, Lu) gelöst in 1 M Natriumacetatlösung versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Zersetzung von Estergruppen wurden die Proben mit 12 N Natronlauge auf pH 11,9 eingestellt und 20 in bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden mit 12 N Salzsäure neutralisiert und vereinigt (Gesamtproteingehalt ca. 180 µg). Die Mischung wurde mittels Makrospincolumns aufgereinigt und mittels SCX fraktioniert (Vgl. Kapitel „SCX“). Für die Makrospincolumns wurde die Hälfte der Probe (90 µg) genutzt und die SCX wurde mit dem zuletzt verwendeten Gradienten mit Ammoniumformiat durchgeführt. Die getrockneten SCX-Fractionen wurden in jeweils 100 µL Lösemittel (79,5 % Wasser, 20 % ACN, 0,5 % FA (v/v/v)) aufgenommen und wie die Proben im Kapitel „ICPL-Markierung der *B. bacteriovorus* Proben auf Peptidebene“ mittels nanoLC und einer LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) analysiert wobei der 35 min Gradient aus dem Kapitel „Optimierung der MeCAT-Reaktion“ genutzt wurde.

Datenauswertung

Die Analyse der massenspektrometrischen Daten erfolgte mithilfe der Proteome Discoverer Software (Version 1.4.0.288, Thermo Fisher Scientific). Die mit MeCAT-IA markierten Proteine wurden mit der in ^[138] beschriebenen Methode ausgewertet. Die Methode, mit der die auf Proteinebene mit ICPL-markierten *B. bacteriovorus* Proben ausgewertet wurden ist in Tabelle 29 dargestellt. Für die Proteinidentifizierung wurde ein FASTA-File für *E. coli* K-12 (Stand 20.07.2017) und ein FASTA-File für *B. bacteriovorus* HD100 (Stand 20.07.2017) aus der UniProt^[88]-Datenbank genutzt. Für die Simulation der Peptide wurde eine neue Protease definiert, die *N*-terminal nach Arginin und Glutaminsäure spaltet.

Tab. 29: Beschreibung der Proteome Discoverer Methode für die Quantifizierung der auf Proteinebene mit ICPL markierten *B. bacteriovorus* Proben.

<p>Peptide Grouping Options</p> <ul style="list-style-type: none"> - Show peptide groups: True - Group peptides by: Mass and Sequence <p>Protein Grouping Options</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enable protein grouping: True - Consider leucine and isoleucine as equal: True - Consider only PSMs with confidence at least: Medium - Consider only PSMs with delta Cn better than: 0.15 - Apply strict maximum parsimony principle: True <p>Data reduction filters:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Protein Score (Search node: Sequest HT, Score threshold: 20) - Peptides Per Protein (Minimal number of peptides: 2, Count only rank 1 peptides: True, Count peptide only in top scored proteins: True) No result filters applied <p>The pipeline tree:</p> <ul style="list-style-type: none"> -(0) Spectrum Files -(1) Spectrum Selector -(2) Sequest HT -(3) Target Decoy PSM Validator -(4) Sequest HT -(3) Target Decoy PSM Validator -(5) Sequest HT -(3) Target Decoy PSM Validator -(6) Sequest HT -(3) Target Decoy PSM Validator -(7) Event Detector -(8) Precursor Ions Quantifier 	<p>Processing node 1: Spectrum Selector</p> <p><u>1. General Settings:</u></p> <p>Precursor Selection: Use MS1 Precursor Use New Precursor Reevaluation: True</p> <p><u>2. Spectrum Properties Filter:</u></p> <p>Lower RT Limit: 0 Upper RT Limit: 0 First Scan: 0 Last Scan: 0 Lowest Charge State: 0 Highest Charge State: 0 Min. Precursor Mass: 350 Da Max. Precursor Mass: 5000 Da Total Intensity Threshold: 0 Minimum Peak Count: 1</p> <p><u>3. Scan Event Filters:</u></p> <p>MS Order: Is MS2 Min. Collision Energy: 0 Max. Collision Energy: 1000 Scan Type: Is Full</p> <p><u>4. Peak Filters:</u></p> <p>S/N Threshold (FT-only): 1.5</p> <p><u>5. Replacements for Unrecognized Properties:</u></p> <p>Unrecognized Charge Replacements: Automatic Unrecognized Mass Analyzer Replacements: ITMS Unrecognized MS Order Replacements: MS2 Unrecognized Activation Type Replacements: CID Unrecognized Polarity Replacements: +</p> <p><u>6. Just for Testing:</u></p> <p>Precursor Clipping Range Before: 2.5 Da Precursor Clipping Range After: 5.5 Da</p>
---	--

Processing node 2: Sequest HT1. Input Data:

Protein Database:

uniprot_170720_Bbacteriovorus_strainHD100_r+ur.
fasta

Enzyme Name: ICPL_Try_GluC(ABC) (Full)

Max. Missed Cleavage Sites: 2

Min. Peptide Length: 4

Max. Peptide Length: 144

2. Scoring Options:

Max. Delta Cn: 0.05

Max. Number of Peptides Reported: 10

3. Tolerances:

Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

Fragment Mass Tolerance: 0.6 Da

Use Average Precursor Mass: False

Use Average Fragment Mass: False

4. Spectrum Matching:

Use Neutral Loss a Ions: True

Use Neutral Loss b Ions: True

Use Neutral Loss y Ions: True

Use Flanking Ions: True

Weight of a Ions: 0

Weight of b Ions: 1

Weight of c Ions: 0

Weight of x Ions: 0

Weight of y Ions: 1

Weight of z Ions: 0

5. Dynamic Modifications:

Max. Equal Modifications Per Peptide: 5

Max. Dynamic Modifications Per Peptide: 4

2. Dynamic Modification: Deamidated / +0.984 Da (N)

3. Dynamic Modification: Oxidation / +15.995 Da (M)

4. Dynamic Modification: ICPL:13C(6) / +111.042 Da (K)

6. Static Modifications:

1. Static Modification: acetamide / +57.021 Da

Processing node 3: Target Decoy PSM Validator1. Decoy Database Search:

Target FDR (Strict): 0.01

Target FDR (Relaxed): 0.05

Processing node 4: Sequest HT1. Input Data:

Protein Database:

uniprot_170720_Bbacteriovorus_strainHD100_r+ur.
fasta

Enzyme Name: ICPL_Try_GluC(ABC) (Full)

Max. Missed Cleavage Sites: 2

Min. Peptide Length: 4

Max. Peptide Length: 144

2. Scoring Options:

Max. Delta Cn: 0.05

Max. Number of Peptides Reported: 10

3. Tolerances:

Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

Fragment Mass Tolerance: 0.6 Da

Use Average Precursor Mass: False

Use Average Fragment Mass: False

4. Spectrum Matching:

Use Neutral Loss a Ions: True

Use Neutral Loss b Ions: True

Use Neutral Loss y Ions: True

Use Flanking Ions: True

Weight of a Ions: 0

Weight of b Ions: 1

Weight of c Ions: 0

Weight of x Ions: 0

Weight of y Ions: 1

Weight of z Ions: 0

5. Dynamic Modifications:

Max. Equal Modifications Per Peptide: 5

Max. Dynamic Modifications Per Peptide: 4

2. Dynamic Modification: Oxidation / +15.995 Da (M)

3. Dynamic Modification: Deamidated / +0.984 Da (N)

4. Dynamic Modification: ICPL / +105.021 Da (K)

6. Static Modifications:

1. Static Modification: acetamide / +57.021 Da

Processing node 5: Sequest HT1. Input Data:

Protein Database:

uniprot_170720_Bbacteriovorus_strainHD100_r+ur.
fasta

Enzyme Name: ICPL_Try_GluC(ABC) (Full)

Max. Missed Cleavage Sites: 2

Min. Peptide Length: 4

Max. Peptide Length: 144

2. Scoring Options:

Max. Delta Cn: 0.05

Max. Number of Peptides Reported: 10

3. Tolerances:

Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

Fragment Mass Tolerance: 0.6 Da

Use Average Precursor Mass: False

Use Average Fragment Mass: False

4. Spectrum Matching:

Use Neutral Loss a Ions: True

Use Neutral Loss b Ions: True

Use Neutral Loss y Ions: True

Use Flanking Ions: True

Weight of a Ions: 0

Weight of b Ions: 1

Weight of c Ions: 0

Weight of x Ions: 0

Weight of y Ions: 1

Weight of z Ions: 0

5. Dynamic Modifications:

Max. Equal Modifications Per Peptide: 5

Max. Dynamic Modifications Per Peptide: 4

2. Dynamic Modification: Deamidated / +0.984 Da (N)

3. Dynamic Modification: Oxidation / +15.995 Da (M)

4. Dynamic Modification: ICPL:2H(4) / +109.047 Da (K)

6. Static Modifications:

1. Static Modification: acetamide / +57.021 Da

Processing node 6: Sequest HT

1. Input Data:

Protein Database:

uniprot_170720_Bbacteriovorus_strainHD100_r+ur.
fasta

Enzyme Name: ICPL_Try_GluC(ABC) (Full)

Max. Missed Cleavage Sites: 2

Min. Peptide Length: 4

Max. Peptide Length: 144

2. Scoring Options:

Max. Delta Cn: 0.05

Max. Number of Peptides Reported: 10

3. Tolerances:

Precursor Mass Tolerance: 10 ppm

Fragment Mass Tolerance: 0.6 Da

Use Average Precursor Mass: False

Use Average Fragment Mass: False

4. Spectrum Matching:

Use Neutral Loss a Ions: True

Use Neutral Loss b Ions: True

Use Neutral Loss y Ions: True

Use Flanking Ions: True

Weight of a Ions: 0

Weight of b Ions: 1

Weight of c Ions: 0

Weight of x Ions: 0

Weight of y Ions: 1

Weight of z Ions: 0

5. Dynamic Modifications:

Max. Equal Modifications Per Peptide: 5

Max. Dynamic Modifications Per Peptide: 4

2. Dynamic Modification: Deamidated / +0.984 Da (N)

3. Dynamic Modification: Oxidation / +15.995 Da (M)

4. Dynamic Modification: ICPL:13C(6)2H(4) / +115.067 Da (K)

6. Static Modifications:

1. Static Modification: acetamide / +57.021 Da

Processing node 7: Event Detector

1. General Settings:

Mass Precision: 4 ppm

S/N Threshold: 1

Processing node 8: Precursor Ions Quantifier

1. Quantification Method:

Quantification Method: ICPL_4plex (Custom)

2. Isotope Pattern Identification:

RT Tolerance of Isotope Pattern Multiplets [min]: 1

Single-Peak/Missing Channels Allowed: 4

Quan Channels:

ICPL_0:

- ICPL_0_K: ICPL / +105.021 Da (K)

ICPL_4:

- ICPL_4_K: ICPL:2H(4) / +109.047 Da (K)

ICPL_6:

- ICPL_6_K: ICPL:13C(6) / +111.042 Da (K)

ICPL_10:

- ICPL_10_K: ICPL:13C(6)2H(4) / +115.067 Da (K)

Ratio Calculation:

➔ Minimum Quan Value Detected = 4629.8

➔ Minimum Quan Value Used = 4629.8

Ratio Reporting:

ICPL_0/ICPL_10

ICPL_0/ICPL_4

ICPL_0/ICPL_6

ICPL_10/ICPL_0

ICPL_10/ICPL_4

ICPL_10/ICPL_6

ICPL_4/ICPL_0

ICPL_4/ICPL_10

ICPL_4/ICPL_6

ICPL_6/ICPL_0

ICPL_6/ICPL_10

ICPL_6/ICPL_4

Die Proben, die auf Peptidebene markiert wurden, wurden mit fast der gleichen Methode ausgewertet. Unterschiede bestanden darin, dass Trypsin verwendet wird, dass alle *N*-Termini bei der Identifizierung mit ICPL markiert sind und dass diese auch für die Quantifizierung genutzt werden.

Die Proben, die mit DOTA-NHS markiert wurden, wurden ebenfalls mit einer der Markierung auf Peptidebene vergleichbaren Methode ausgewertet, wobei hier ein Swiss-Prot FASTA File (23.06.2015) der UniProt Datenbank genutzt werden. Weiterhin wurden für die Methode isobare Modifikationen für vier Reagenzien mit den Lanthanoiden Terbium, Holmium Thulium und Lutetium eingeführt (Vgl. Tab.30).

Tab. 30: Parameter der in die Proteome Discoverer Software eingefügten isobaren Modifikationen für die DOTA-NHS-Markierungen. Softwarebedingt mussten die *N*-Terminalen und die Seitenkettenmodifikationen separat eingefügt werden.

Name der Modifikation	Kurz-bezeichnung	Monoisotopische Masse	Molare Masse	Summenformel der isobaren Modifikation	Markierungsposition
Tb-NHS-Isobar	Tb-NHS-I	542,081510	542,32895	C ₁₆ H ₂₄ N ₄ O ₁₃ P ₂	K
Ho-NHS-Isobar	Ho-NHS-I	548,087250	548,29106	C ₁₆ H ₃₅ N ₄ O ₃ P ₇	K
Tm-NHS-Isobar	Tm-NHS-I	552,090830	552,28534	C ₁₇ H ₄₁ N ₂ P ₉	K
Lu-NHS-Isobar	Lu-NHS-I	558,097240	558,35690	C ₁₆ H ₁₉ N ₁₀ O ₁₁ P	K
Ho-NHS-Isobar	Ho-NHS-I	548,087250	548,29106	C ₁₆ H ₃₅ N ₄ O ₃ P ₇	<i>N</i> -Terminus
Lu-NHS-Isobar	Lu-NHS-I	558,097240	558,35690	C ₁₆ H ₁₉ N ₁₀ O ₁₁ P	<i>N</i> -Terminus
Tb-NHS-Isobar	Tb-NHS-I	542,081510	542,32895	C ₁₆ H ₂₄ N ₄ O ₁₃ P ₂	<i>N</i> -Terminus
Tm-NHS-Isobar	Tm-NHS-I	552,090830	552,28534	C ₁₇ H ₄₁ N ₂ P ₉	<i>N</i> -Terminus

Nach der Identifizierung und Quantifizierung der Proteine in den ICPL-Ansätzen mit dem Proteome Discoverer wurden die Daten mithilfe von Microsoft Excel 2013 (Version 15.0.4997.1000, Microsoft Office Professional Plus 2013, Microsoft Corporation) logarithmisch ausgewertet. Für die Bestimmung des Medians und des Varianzkoeffizienten wurde das in Tabelle 31 beschriebene Visual Basic (VBA) Makro verwendet. Die weitere Datenauswertung kann dem Kapitel 3.5 („Analyse der massenspektrometrischen Daten“) entnommen werden.

Tab. 31: Quellcode des VBA-Makros zur Bestimmung des Medians und des Varianzkoeffizienten aus den logarithmischen Quantifizierungsdaten der *B. bacteriovorus* Proben.

```
Sub LnMedian_relErrorTotal()
    Dim ol As String, ac As String, de As String, gea As Double, gza As Double, gda As Double, gzge As Double,
    gdge As Double, gdgz As Double, q As String, a As Integer, b As Integer, x As Integer, e1 As String, e2 As
    String, e3 As String, e4 As String, e5 As String, e6 As String
    Dim y1 As Integer, y2 As Integer, y3 As Integer, y4 As Integer, y5 As Integer, y6 As Integer, k As Integer,
    rc1 As Integer, cvgea As Variant, cvgza As Variant, cvgda As Variant, cvgzge As Variant, cvgdge As Variant,
    cvgdgz As Variant, tcv As Variant
    a = 2
    b = 2
    x = 2
    q = ActiveSheet.Name
    Sheets.Add
    ActiveSheet.Name = „Median+Error-„ & q
    Cells(1, 1) = „Ordered Locus“
    Cells(1, 2) = „Accession“
    Cells(1, 3) = „Description“
    Cells(1, 4) = „Ln(ICPL4/0)“
    Cells(1, 5) = „Ln(ICPL6/0)“
    Cells(1, 6) = „Ln(ICPL10/0)“
    Cells(1, 7) = „Ln(ICPL6/4)“
    Cells(1, 8) = „Ln(ICPL10/4)“
    Cells(1, 9) = „Ln(ICPL10/6)“
    Cells(1, 11) = „CV(4/0)“
    Cells(1, 12) = „CV(6/0)“
    Cells(1, 13) = „CV(10/0)“
    Cells(1, 14) = „CV(6/4)“
    Cells(1, 15) = „CV(10/4)“
    Cells(1, 16) = „CV(10/6)“
    Sheets(q).Select
    While Cells(a, 3) <> Empty
        Sheets(q).Select
        gea = 0
        gza = 0
        gda = 0
        gzge = 0
        gdge = 0
        gdgz = 0
        cvgea = 0
        cvgza = 0
        cvgda = 0
        cvgzge = 0
        cvgdge = 0
        cvgdgz = 0
        tcv = „“
        y1 = 1
        y2 = 1
        y3 = 1
        y4 = 1
        y5 = 1
        y6 = 1
        ol = „“
        ac = „“
        de = „“
```

```

e1 = „c“
e2 = „c“
e3 = „c“
e4 = „c“
e5 = „c“
e6 = „c“
b = b + 1
rc1 = 1
While Cells(b, 3) = Cells(a, 3)
    b = b + 1
Wend
b = b - 1
ol = Cells(a, 2)
ac = Cells(a, 3)
de = Cells(a, 4)
rc1 = Application.Count(Range(Cells(a, 5), Cells(b, 5)))
If Application.WorksheetFunction.Count(Range(Cells(a, 5), Cells(b, 5))) = 0 Then
    e1 = „“
    y1 = 2
Else
    gea = Application.WorksheetFunction.Median(Range(Cells(a, 5), Cells(b, 5)))
    tcv = MAD(Range(Cells(a, 5), Cells(b, 5)))
    tcv = 1.4826 * tcv
    tcv = tcv * tcv
    tcv = Exp(tcv)
    tcv = tcv - 1
    tcv = Sqr(tcv)
    cvgea = tcv
    tcv = „“
    If a = b Then
        y1 = 2
        cvgea = „“
    ElseIf rc1 = 1 Then
        y1 = 2
        cvgea = „“
    ElseIf rc1 > 2 Then
        y1 = 3
    End If
End If
rc1 = 1
rc1 = Application.Count(Range(Cells(a, 6), Cells(b, 6)))
If Application.WorksheetFunction.Count(Range(Cells(a, 6), Cells(b, 6))) = 0 Then
    e2 = „“
    y2 = 2
Else
    gza = Application.WorksheetFunction.Median(Range(Cells(a, 6), Cells(b, 6)))
    tcv = MAD(Range(Cells(a, 6), Cells(b, 6)))
    tcv = 1.4826 * tcv
    tcv = tcv * tcv
    tcv = Exp(tcv)
    tcv = tcv - 1
    tcv = Sqr(tcv)
    cvgza = tcv
    tcv = „“
    If a = b Then
        y2 = 2

```

```

        cvgza = „“
    ElseIf rc1 = 1 Then
        y2 = 2
        cvgza = „“
    ElseIf rc1 > 2 Then
        y2 = 3
    End If
End If
rc1 = 1
rc1 = Application.Count(Range(Cells(a, 7), Cells(b, 7)))
If Application.WorksheetFunction.Count(Range(Cells(a, 7), Cells(b, 7))) = 0 Then
    e3 = „“
    y3 = 2
Else
    gda = Application.WorksheetFunction.Median(Range(Cells(a, 7), Cells(b, 7)))
    tcv = MAD(Range(Cells(a, 7), Cells(b, 7)))
    tcv = 1.4826 * tcv
    tcv = tcv * tcv
    tcv = Exp(tcv)
    tcv = tcv - 1
    tcv = Sqr(tcv)
    cvgda = tcv
    tcv = „“
    If a = b Then
        y3 = 2
        cvgda = „“
    ElseIf rc1 = 1 Then
        y3 = 2
        cvgda = „“
    ElseIf rc1 > 2 Then
        y3 = 3
    End If
End If
rc1 = 1
rc1 = Application.Count(Range(Cells(a, 8), Cells(b, 8)))
If Application.WorksheetFunction.Count(Range(Cells(a, 8), Cells(b, 8))) = 0 Then
    e4 = „“
    y4 = 2
Else
    gzge = Application.WorksheetFunction.Median(Range(Cells(a, 8), Cells(b, 8)))
    tcv = MAD(Range(Cells(a, 8), Cells(b, 8)))
    tcv = 1.4826 * tcv
    tcv = tcv * tcv
    tcv = Exp(tcv)
    tcv = tcv - 1
    tcv = Sqr(tcv)
    cvgzge = tcv
    tcv = „“
    If a = b Then
        y4 = 2
        cvgzge = „“
    ElseIf rc1 = 1 Then
        y4 = 2
        cvgzge = „“
    ElseIf rc1 > 2 Then
        y4 = 3
    End If
End If

```

```

End If
End If
rc1 = 1
rc1 = Application.Count(Range(Cells(a, 9), Cells(b, 9)))
If Application.WorksheetFunction.Count(Range(Cells(a, 9), Cells(b, 9))) = 0 Then
    e5 = „
    y5 = 2
Else
    gdge = Application.WorksheetFunction.Median(Range(Cells(a, 9), Cells(b, 9)))
    tcv = MAD(Range(Cells(a, 9), Cells(b, 9)))
    tcv = 1.4826 * tcv
    tcv = tcv * tcv
    tcv = Exp(tcv)
    tcv = tcv - 1
    tcv = Sqr(tcv)
    cvgdge = tcv
    tcv = „
    If a = b Then
        y5 = 2
        cvgdge = „
    ElseIf rc1 = 1 Then
        y5 = 2
        cvgdge = „
    ElseIf rc1 > 2 Then
        y5 = 3
    End If
End If
rc1 = 1
rc1 = Application.Count(Range(Cells(a, 10), Cells(b, 10)))
If Application.WorksheetFunction.Count(Range(Cells(a, 10), Cells(b, 10))) = 0 Then
    e6 = „
    y6 = 2
Else
    gdgz = Application.WorksheetFunction.Median(Range(Cells(a, 10), Cells(b, 10)))
    tcv = MAD(Range(Cells(a, 10), Cells(b, 10)))
    tcv = 1.4826 * tcv
    tcv = tcv * tcv
    tcv = Exp(tcv)
    tcv = tcv - 1
    tcv = Sqr(tcv)
    cvgdgz = tcv
    tcv = „
    If a = b Then
        y6 = 2
        cvgdgz = „
    ElseIf rc1 = 1 Then
        y6 = 2
        cvgdgz = „
    ElseIf rc1 > 2 Then
        y6 = 3
    End If
End If
rc1 = 1
Sheets(„Median+Error-„ & q).Select
Cells(x, 1) = ol
Cells(x, 2) = ac

```



```

Cells(x, 3) = de
,Gibt entweder Median oder Empty aus
If e1 = „“ Then
    Cells(x, 4) = e1
    Cells(x, 11) = e1
Else
    Cells(x, 4) = gea
    Cells(x, 11) = cvgea
End If
If e2 = „“ Then
    Cells(x, 5) = e2
    Cells(x, 12) = e2
Else
    Cells(x, 5) = gza
    Cells(x, 12) = cvgza
End If
If e3 = „“ Then
    Cells(x, 6) = e3
    Cells(x, 13) = e3
Else
    Cells(x, 6) = gda
    Cells(x, 13) = cvgda
End If
If e4 = „“ Then
    Cells(x, 7) = e4
    Cells(x, 14) = e4
Else
    Cells(x, 7) = gzge
    Cells(x, 14) = cvgzge
End If
If e5 = „“ Then
    Cells(x, 8) = e5
    Cells(x, 15) = e5
Else
    Cells(x, 8) = gdge
    Cells(x, 15) = cvgdge
End If
If e6 = „“ Then
    Cells(x, 9) = e6
    Cells(x, 16) = e6
Else
    Cells(x, 9) = gdgz
    Cells(x, 16) = cvgdgz
End If
,färbt bei Median statt Einzelwert
If y1 = 1 Then
    Cells(x, 4).Interior.Color = RGB(255, 255, 200)
Elseif y1 = 3 Then
    Cells(x, 4).Interior.Color = RGB(255, 204, 153)
End If
If y2 = 1 Then
    Cells(x, 5).Interior.Color = RGB(255, 255, 200)
Elseif y2 = 3 Then
    Cells(x, 5).Interior.Color = RGB(255, 204, 153)
End If
If y3 = 1 Then

```

```

Cells(x, 6).Interior.Color = RGB(255, 255, 200)
Elseif y3 = 3 Then
Cells(x, 6).Interior.Color = RGB(255, 204, 153)
End If
If y4 = 1 Then
Cells(x, 7).Interior.Color = RGB(255, 255, 200)
Elseif y4 = 3 Then
Cells(x, 7).Interior.Color = RGB(255, 204, 153)
End If
If y5 = 1 Then
Cells(x, 8).Interior.Color = RGB(255, 255, 200)
Elseif y5 = 3 Then
Cells(x, 8).Interior.Color = RGB(255, 204, 153)
End If
If y6 = 1 Then
Cells(x, 9).Interior.Color = RGB(255, 255, 200)
Elseif y6 = 3 Then
Cells(x, 9).Interior.Color = RGB(255, 204, 153)
End If
x = x + 1
b = b + 1
a = b
Sheets(q).Select
Wend
Sheets(„Median+Error-„ & q).Select
End Sub

```

Anwendung des internen Standards auf Modellproteine

Die Tests zum internen Standard wurden an den Modellproteinen α -Lactalbumin und bovinen Serumalbumin durchgeführt. Die Modellproteine wurden je nach Experiment (Vgl. Kapitel 3.8) mit Lu- bzw. Tm-MeCAT-IA markiert. Die Markierung erfolgte mit den optimierten Markierungsbedingungen bei gleichen Konzentrationen, wie im Kapitel „Optimierung der MeCAT-Reaktion“ beschrieben. Anschließend wurden Polyacrylamidgele, wie im Kapitel „Gelelektrophorese“ beschrieben, hergestellt. Allerdings wurden den Trenngellösungen (Gesamtvolumen 20 mL) vor der Zugabe von Radikalstarter und Katalysator jeweils 20 μ L 20 mM MeCAT-Reagenz mit Acrylamidfunktionalität zugegeben. Je nach Experiment wurden die Metalle Yttrium, Praseodym oder Thulium verwendet. Anschließend wurde die Gelelektrophorese, wie im Kapitel „Gelelektrophorese“ beschrieben durchgeführt, wobei die Proteine in unterschiedlichen Verhältnissen auf die Gele gegeben wurden. Beim Gel zur Bestimmung der homogenen Verteilung des Standards wurden, außer einem RotiMark-Standard, keine Proteine auf das Gel gegeben. Nach dem Entfärben der Gele wurden die Gele

dreimal für 10 min mit Glycerol überschichtet, um die Gele zu entwässern. Nach dem letzten Entwässerungsschritt wurden die Gele über Nacht an Luft getrocknet.

Jene Gelstücke, die zur Überprüfung der homogenen Verteilung herangezogen wurden, wurden mit einer Pipettenspitze ausgestanzt. Zur Vorbereitung auf die Analyse wurden die Gele mit 250 µL konzentrierter Salpetersäure und 50 µL Wasserstoffperoxidlösung versetzt und für 1 h bei 95°C erwärmt. Anschließend wurden noch drei weitere Male 50 µL Wasserstoffperoxid zu den Proben gegeben, wobei nach den ersten beiden Zugaben wiederum 1 h bei 95°C erwärmt. Nach der letzten Zugabe wurden die Proben über Nacht bei 95°C an Luft getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 1 mL 3,5 % (w/w) Salpetersäure aufgenommen, welche 250 ppt (w/w) Bismutstandard enthielt. Die Proben wurden nochmals fünffach mit derselben Lösung verdünnt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Direktinjektion-ICP-MS. Die Analyse erfolgte durch Selbstansaugung über einen Meinhard-Mikrozerstäuber mit einer typischen Flussrate von 50 µL/min an einem Element XR (Thermo Fisher Scientific) mit Argon als Plasmagas. Das Gerät wurde jeweils tagesaktuell mittels verdünnter Lanthanoidsalzstandardlösung nach hoher Intensität der verwendeten Lanthanoide getunt. Es wurde mit einem Kühlgasfluss von 15 L/min, einem Hilfgasfluss von 1 L/min und ein Probengasfluss von 1,3 L/min bei einer Plasmaleistung von 900 W gearbeitet. Für die externe Kalibrierung wurden Lösungen mit definierten Konzentrationen des jeweiligen zu analysierenden Elements hergestellt, wobei die Lösung auch 250 ppt (w/w) Bismut und 3,5 % (w/w) Salpetersäure enthielten. Es wurden immer drei Lösungen mit jeweils 0, 50, 100, 250, 500 und 750 ppt (w/w) des Elements, welches als interner Standard mit den Gelen copolymerisiert wurden, hergestellt. In Abbildung 37 ist die Kalibriergerade des ersten Experiments (Vgl. Kapitel 3.8) dargestellt.

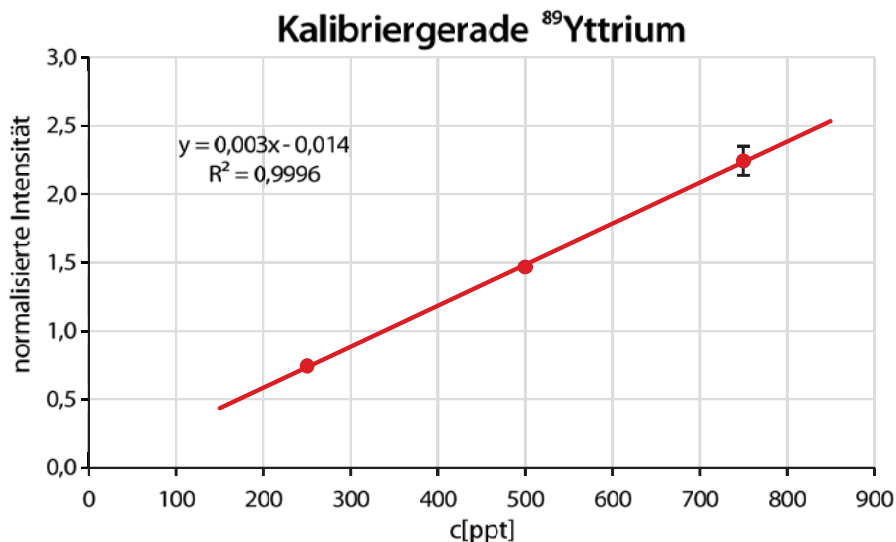


Abb. 37: Kalibriergerade für die Bestimmung der absoluten Mengen an internen Standard (^{89}Y), um zu überprüfen, ob das Element homogen im Gel verteilt ist. Aufgrund sehr großer Streuungen konnten nur die drei konzentriertesten Proben der Kalibrierung berücksichtigt werden. Jedoch lagen auch die Proben in diesem Bereich.

Die Gelbanden, die mittels LA-ICP-MS analysiert wurden, wurden ebenfalls ausgeschnitten und auf Objektträger übertragen. Die Analyse erfolgte an einem UP-213 Laser AblationSystem (New Wave Research) mit einer SuperCellTM als Ablationszelle. Als Laser wurde ein Nd:YAG Laser bei einer Wellenlänge von 213 nm und als Transportgas wurde Helium bei einem Fluss von 0,2 L/min verwendet. Die ICP-MS-Parameter waren die Gleichen wie bei der Direktinjektion, wobei das Tuning mit einem Spurenelementstandard in Glas (SRM 612, NIST) erfolgte. Die Ablation erfolgte bei einer Laserenergie von 100% und bei 20 Hz mit einer Aufwärmzeit im Bereich von 20 s und einer Auswaschzeit von 1 bis 2 min (abhängig von Ablationszeit). Das Abrastern der Oberfläche erfolgte bei einer Spotgröße von 100 μm mit 20 μm Überlapp bei 135 $\mu\text{m/s}$. Die ICP-MS-Messungen erfolgten mit einer Verzögerung von 10 s, wobei im Speed-Mode für jedes relevante Element jeweils etwa 10 Spektren/s aufgenommen wurden. Die Datenanalyse erfolgte mit OriginPro 2017 (Version b9.4.0.0220, OriginLab Corporation). Durch Abgleich mit Mikroskopaufnahmen (DigiMicro Profi, dnt) wurden jeweils etwa 4,5 s Tot- und Auswaschzeit (entsprechend jeweils ca. 0,6 mm) vom Beginn bzw. vom Ende der Ablationsbilder abgezogen. Flächenintensitäten wurden mithilfe der ROI-Funktion bestimmt.

Anwendung des internen Standards auf *B. bacteriovorus* Proben

Jeweils 10 µL der AP-Probe und der Probe 30 min nach der Penetration (Vergleich Kapitel „Lyse der *B. bacteriovorus* Proben“) des zweiten Probensatzes wurden mit 10 µL ICPL-Lysepuffer versetzt und auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Es wurden 2,6 µL 50 mM TCEP-Lösung zu den Proben gegeben und diese für 30 min bei 60°C inkubiert. Die AP-Probe wurde mit 13 µL 20 mM Ho-MeCAT-IA und die GP-Probe mit 13 µL 20 mM Lu-MeCAT-IA versetzt. Die Proben wurden 1 min mit Ultraschall behandelt und für 2,5 h bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde 1 µL der Stopplösung 1 des ICPL-Kits zu den Proben gegeben und die Proben 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte erst eine Acetonfällung, wie im Kapitel „Lyse der *B. bacteriovorus* Proben“ beschrieben und Anschließend eine Gelelektrophorese, wie im Kapitel „Gelelektrophorese“ beschrieben. Dem Trenngel wurden beim Ansetzen 5 µL einer Lösung von 20mM Tm-MeCAT mit Acrylamidfunktionalität als interner Standard zugegeben. Die Proben wurden jeweils einzeln in separaten Geltaschen und als 1:1 (v/v) Mischung auf das Gel gegeben. Die Prozessierung erfolgte wie im Kapitel „Anwendung des internen Standards auf Modellproteine“ beschrieben, wobei nach dem Trocknen jeweils die gesamte Proteinbande ausgeschnitten wurde und auf Objektträger gegeben wurden. Die Analyse mittels LA-ICP-MS erfolgte, wie im gleichen Kapitel beschrieben. Von jeder Gelbande wurden jeweils fünf Ablationslinien in 50 µM Abstand (d. h. ohne Überlapp) ablatiert wobei die Isotope ¹⁶⁵Ho, ¹⁶⁹Tm und ¹⁷⁵Lu gemessen wurden. Die Datenanalyse erfolgte ebenfalls mithilfe von Origin, wobei aus den fünf Ablationslinien jeweils eine mittlere Intensität ermittelt wurde.

6 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AP	engl. <i>attack phase</i>
APy	frisch geschlüpfte Zellen der Angriffsphase
ATP	Adenosintriphosphat
BALOs	engl. <i>Bdellovibrio-and-like organisms</i>
c-di-GMP	engl. <i>cyclic diguanylate monophosphate</i>
CID	engl. <i>collision-induced dissociation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESI	Elektrosprayionisierung
FA	Ameisensäure
FTICR-MS	engl. <i>fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer</i>
FT-MS	Fourier-Transformation-Massenspektrometer
GP	engl. <i>growth phase</i>
GP0.5h	<i>B. bacteriovorus</i> Probe 0,5 h nach Penetration
GP1h	<i>B. bacteriovorus</i> Probe 1 h nach Penetration
GP2h	<i>B. bacteriovorus</i> Probe 2 h nach Penetration
GP3h	<i>B. bacteriovorus</i> Probe 3 h nach Penetration
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>

ICAT	engl. <i>isotope-coded affinity tag</i>
ICP	engl. <i>inductively coupled plasma</i>
ICPL	engl. <i>isotope-coded protein label</i>
iTRAQ	engl. <i>isobaric tags for absolute and relative quantification</i>
LA	Laserablation
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MAD	engl. <i>median absolute deviation</i>
MALDI	engl. <i>matrix-assisted laser desorption and ionization</i>
MDR	engl. <i>multidrug-resistant</i>
MeCAT	engl. <i>metal-coded affinity tag</i>
MeCAT-IA	MeCAT-Reagenz mit Iodacetamidreaktivität
MeCAT-Mal	MeCAT-Reagenz mit Maleinimidreaktivität
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MRSA	engl. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	einstufiges Fragmentierungsexperiment
MS ⁿ	Massenspektrometrieexperiment mit n-1 Fragmentierungsschritten
nanoLC	engl. <i>nano-flow</i> HPLC
NHS	N-hydroxysuccinimid
Omp	engl. <i>outer membrane protein</i>
PD	engl. <i>prey-dependent</i>
PDR	engl. <i>pandrug-resistant</i>
PI	engl. <i>prey-independent</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-seq	engl. <i>RNA sequencing</i>
ROI	engl. <i>region of interest</i>

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SCX	engl. <i>strong cation exchange</i>
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SILAC	engl. <i>stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VBA	Visual Basic
XDR	engl. <i>extensively drug-resistant</i>

7 Literaturverzeichnis

- [1] Lambert, C., Hobley, L., Chang, C. Y., Fenton, A., Capeness, M., Sockett, L., „A predatory patchwork: membrane and surface structures of *Bdellovibrio bacteriovorus*“, *Adv Microb Physiol* **2009**, 54, 313-361.
- [2] Cantas, L., Shah, S. Q., Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Burgmann, H., Sorum, H., „A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota“, *Front Microbiol* **2013**, 4, 96.
- [3] Pouillard, J., „[A forgotten discovery: doctor of medicine Ernest Duchesne's thesis (1874-1912)]“, *Hist Sci Med* **2002**, 36 (1), 11-20.
- [4] Fleming, A., „On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. Influenzae*.“, *British Journal of Experimental Pathology* **1929**, 10 (3), 226-236.
- [5] Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D. G., „Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis“, *J Infect Dev Ctries* **2014**, 8 (2), 129-136.
- [6] Magiorakos, A. P., et al., „Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance“, *Clin Microbiol Infect* **2012**, 18 (3), 268-281.
- [7] WHO, „Drug-resistant TB: XDR-TB FAQ“, (letzter Zugriff: 02.11.2017), <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/en/>.
- [8] Klevens, R. M., et al., „Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States“, *Jama-Journal of the American Medical Association* **2007**, 298 (15), 1763-1771.
- [9] Falagas, M. E., Bliziotis, I. A., Kasiakou, S. K., Samonis, G., Athanassopoulou, P., Michalopoulos, A., „Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria“, *BMC Infect Dis* **2005**, 5, 24.
- [10] Allen, H. K., Trachsel, J., Looft, T., Casey, T. A., „Finding alternatives to antibiotics“, *Ann N Y Acad Sci* **2014**, 1323, 91-100.
- [11] Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Harvey, R. B., Genovese, K. J., Kennedy, C. N., Venn, D. W., Nisbet, D. J., „Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease“, *Anim Health Res Rev* **2008**, 9 (2), 217-225.
- [12] Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., Drider, D., „Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*“, *Res Microbiol* **2011**, 162 (2), 99-107.
- [13] Fischetti, V. A., „Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives“, *Trends Microbiol* **2005**, 13 (10), 491-496.
- [14] Moore, A., „Finding my enemy's enemies“, *EMBO Rep* **2004**, 5 (8), 754-757.
- [15] Stolp, H., Starr, M. P., „*Bdellovibrio Bacteriovorus* Gen. Et Sp. N., a Predatory, Ectoparasitic, and Bacteriolytic Microorganism“, *Antonie Van Leeuwenhoek* **1963**, 29, 217-248.
- [16] Crossman, L. C., et al., „A small predatory core genome in the divergent marine *Bacteriovorax marinus* SJ and the terrestrial *Bdellovibrio bacteriovorus*“, *ISME J* **2013**, 7 (1), 148-160.

- [17] Lu, F., Cai, J., „*The protective effect of Bdellovibrio-and-like organisms (BALO) on tilapia fish fillets against Salmonella enterica ssp. enterica serovar Typhimurium*“, *Lett Appl Microbiol* **2010**, 51 (6), 625-631.
- [18] Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Nicoletti, M., Gagliardi, A., De Biase, R. V., Cucchiara, S., Nencioni, L., Conte, M. P., Schippa, S., „*Higher prevalence and abundance of Bdellovibrio bacteriovorus in the human gut of healthy subjects*“, *PLoS One* **2013**, 8 (4), e61608.
- [19] Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., Appel, B., „*Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals*“, *Syst Appl Microbiol* **2001**, 24 (3), 385-394.
- [20] Ganuza, E., Sellers, C. E., Bennett, B. W., Lyons, E. M., Carney, L. T., „*A Novel Treatment Protects Chlorella at Commercial Scale from the Predatory Bacterium Vampirovibrio chlorellavorus*“, *Front Microbiol* **2016**, 7, 848.
- [21] Li, N., Wang, K., Williams, H. N., Sun, J., Ding, C., Leng, X., Dong, K., „*Analysis of gene gain and loss in the evolution of predatory bacteria*“, *Gene* **2017**, 598, 63-70.
- [22] Iebba, V., et al., „*Bdellovibrio bacteriovorus directly attacks Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus Cystic fibrosis isolates*“, *Front Microbiol* **2014**, 5, 280.
- [23] Monnappa, A. K., Dwidar, M., Seo, J. K., Hur, J. H., Mitchell, R. J., „*Bdellovibrio bacteriovorus inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and invasion into human epithelial cells*“, *Sci Rep* **2014**, 4, 3811.
- [24] Seidler, R. J., Baptist, J. N., Mandel, M., „*Molecular Heterogeneity of Bdellovibrios - Evidence of 2 New Species*“, *Journal of Bacteriology* **1972**, 109 (1), 209-&.
- [25] Pasternak, Z., Njagi, M., Shani, Y., Chanyi, R., Rotem, O., Lurie-Weinberger, M. N., Koval, S., Pietrokovski, S., Gophna, U., Jurkevitch, E., „*In and out: an analysis of epibiotic vs periplasmic bacterial predators*“, *ISME J* **2014**, 8 (3), 625-635.
- [26] Nunez, M. E., Martin, M. O., Chan, P. H., Spain, E. M., „*Predation, death, and survival in a biofilm: Bdellovibrio investigated by atomic force microscopy*“, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2005**, 42 (3-4), 263-271.
- [27] Negus, D., Moore, C., Baker, M., Raghunathan, D., Tyson, J., Sockett, R. E., „*Predator Versus Pathogen: How Does Predatory Bdellovibrio bacteriovorus Interface with the Challenges of Killing Gram-Negative Pathogens in a Host Setting?*“, *Annu Rev Microbiol* **2017**, 71, 441-457.
- [28] Lambert, C., Ivanov, P., Sockett, R. E., „*A transcriptional "Scream" early response of E. coli prey to predatory invasion by Bdellovibrio*“, *Curr Microbiol* **2010**, 60 (6), 419-427.
- [29] Gallet, R., Tully, T., Evans, M. E., „*Ecological conditions affect evolutionary trajectory in a predator-prey system*“, *Evolution* **2009**, 63 (3), 641-651.
- [30] Shatzkes, K., Chae, R., Tang, C., Ramirez, G. C., Mukherjee, S., Tsenova, L., Connell, N. D., Kadouri, D. E., „*Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of Bdellovibrio bacteriovorus and Micavibrio aeruginosavorus in a mouse model*“, *Sci Rep* **2015**, 5, 12899.
- [31] Shatzkes, K., et al., „*Predatory Bacteria Attenuate Klebsiella pneumoniae Burden in Rat Lungs*“, *MBio* **2016**, 7 (6).
- [32] Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., Dharani, S., Rinaggio, J., Kadouri, D. E., Connell, N. D., „*Examining the efficacy of intravenous administration of predatory bacteria in rats*“, *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 1864.

- [33] Shatzkes, K., Tang, C., Singleton, E., Shukla, S., Zuenen, M., Gupta, S., Dharani, S., Rinaggio, J., Connell, N. D., Kadouri, D. E., „Effect of predatory bacteria on the gut bacterial microbiota in rats", *Sci Rep* **2017**, 7, 43483.
- [34] Romanowski, E. G., Stella, N. A., Brothers, K. M., Yates, K. A., Funderburgh, M. L., Funderburgh, J. L., Gupta, S., Dharani, S., Kadouri, D. E., Shanks, R. M., „Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface", *Sci Rep* **2016**, 6, 30987.
- [35] Gupta, S., Tang, C., Tran, M., Kadouri, D. E., „Effect of Predatory Bacteria on Human Cell Lines", *PLoS One* **2016**, 11 (8), e0161242.
- [36] Monnappa, A. K., Bari, W., Choi, S. Y., Mitchell, R. J., „Investigating the Responses of Human Epithelial Cells to Predatory Bacteria", *Sci Rep* **2016**, 6, 33485.
- [37] Atterbury, R. J., Hobley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., Fenton, A. K., Barrow, P., Sockett, R. E., „Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks", *Appl Environ Microbiol* **2011**, 77 (16), 5794-5803.
- [38] Shanks, R. M., Davra, V. R., Romanowski, E. G., Brothers, K. M., Stella, N. A., Godbole, D., Kadouri, D. E., „An Eye to a Kill: Using Predatory Bacteria to Control Gram-Negative Pathogens Associated with Ocular Infections", *PLoS One* **2013**, 8 (6), e66723.
- [39] Van Essche, M., Quirynen, M., Sliepen, I., Van Eldere, J., Teughels, W., „*Bdellovibrio bacteriovorus* attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*", *J Dent Res* **2009**, 88 (2), 182-186.
- [40] Dashiff, A., Junka, R. A., Libera, M., Kadouri, D. E., „Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*", *J Appl Microbiol* **2011**, 110 (2), 431-444.
- [41] Dharani, S., Kim, D. H., Shanks, R. M. Q., Doi, Y., Kadouri, D. E., „Susceptibility of colistin-resistant pathogens to predatory bacteria", *Res Microbiol* **2017**.
- [42] Sun, Y., Ye, J., Hou, Y., Chen, H., Cao, J., Zhou, T., „Predation Efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on Multidrug-Resistant Clinical Pathogens and Their Corresponding Biofilms", *Jpn J Infect Dis* **2017**, 70 (5), 485-489.
- [43] Hobley, L., King, J. R., Sockett, R. E., „*Bdellovibrio* predation in the presence of decoys: Three-way bacterial interactions revealed by mathematical and experimental analyses", *Appl Environ Microbiol* **2006**, 72 (10), 6757-6765.
- [44] Loozen, G., Boon, N., Pauwels, M., Slomka, V., Rodrigues Herrero, E., Quirynen, M., Teughels, W., „Effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 on multispecies oral communities", *Anaerobe* **2015**, 35 (Pt A), 45-53.
- [45] Dwidar, M., Nam, D., Mitchell, R. J., „Indole negatively impacts predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and its release from the bdelloplast", *Environ Microbiol* **2015**, 17 (4), 1009-1022.
- [46] Im, H., Son, S., Mitchell, R. J., Ghim, C. M., „Serum albumin and osmolality inhibit *Bdellovibrio bacteriovorus* predation in human serum", *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 5896.
- [47] Kim, E. H., Dwidar, M., Mitchell, R. J., Kwon, Y. N., „Assessing the effects of bacterial predation on membrane biofouling", *Water Res* **2013**, 47 (16), 6024-6032.
- [48] Martinez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E., Prieto, M. A., „Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates", *Sci Rep* **2016**, 6, 24381.
- [49] Rendulic, S., et al., „A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective", *Science* **2004**, 303 (5658), 689-692.
- [50] Jashnsaz, H., et al., „Hydrodynamic Hunters", *Biophys J* **2017**, 112 (6), 1282-1289.

- [51] Rotem, O., Pasternak, Z., Shimoni, E., Belausov, E., Porat, Z., Pietrokovski, S., Jurkevitch, E., „Cell-cycle progress in obligate predatory bacteria is dependent upon sequential sensing of prey recognition and prey quality cues", *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, 112 (44), E6028-6037.
- [52] Lambert, C., Chang, C. Y., Capeness, M. J., Sockett, R. E., „The first bite--profiling the predatosome in the bacterial pathogen *Bdellovibrio*", *PLoS One* **2010**, 5 (1), e8599.
- [53] Schwudke, D., Bernhardt, A., Beck, S., Madela, K., Linscheid, M. W., Appel, B., Strauch, E., „Transcriptional activity of the host-interaction locus and a putative pilin gene of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the predatory life cycle", *Curr Microbiol* **2005**, 51 (5), 310-316.
- [54] Beck, S., Schwudke, D., Strauch, E., Appel, B., Linscheid, M., „*Bdellovibrio bacteriovorus* strains produce a novel major outer membrane protein during predacious growth in the periplasm of prey bacteria", *J Bacteriol* **2004**, 186 (9), 2766-2773.
- [55] Evans, K. J., Lambert, C., Sockett, R. E., „Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 requires type IV pili", *J Bacteriol* **2007**, 189 (13), 4850-4859.
- [56] Beck, S., „Characterisation of *Bdellovibrionales* using protein analyses and genetic approaches", Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2005**.
- [57] Grainger, D. C., Busby, S. J., „Global regulators of transcription in *Escherichia coli*: mechanisms of action and methods for study", *Adv Appl Microbiol* **2008**, 65, 93-113.
- [58] Lambert, C., Till, R., Hobley, L., Sockett, R. E., „Mutagenesis of *RpoE*-like sigma factor genes in *Bdellovibrio* reveals differential control of *groEL* and two *groES* genes", *BMC Microbiol* **2012**, 12, 99.
- [59] Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E., Sorek, R., „A global transcriptional switch between the attack and growth forms of *Bdellovibrio bacteriovorus*", *PLoS One* **2013**, 8 (4), e61850.
- [60] Milner, D. S., Till, R., Cadby, I., Lovering, A. L., Basford, S. M., Saxon, E. B., Liddell, S., Williams, L. E., Sockett, R. E., „Ras GTPase-like protein *MglA*, a controller of bacterial social-motility in *Myxobacteria*, has evolved to control bacterial predation by *Bdellovibrio*", *PLoS Genet* **2014**, 10 (4), e1004253.
- [61] Hobley, L., et al., „Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*", *PLoS Pathog* **2012**, 8 (2), e1002493.
- [62] Barel, G., Jurkevitch, E., „Analysis of phenotypic diversity among host-independent mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J", *Arch Microbiol* **2001**, 176 (3), 211-216.
- [63] Horgan, R. P., Kenny, L. C., „‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics", *The Obstetrician & Gynaecologist* **2011**, 13 (3), 189-195.
- [64] Dori-Bachash, M., Dassa, B., Pietrokovski, S., Jurkevitch, E., „Proteome-based comparative analyses of growth stages reveal new cell cycle-dependent functions in the predatory bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*", *Appl Environ Microbiol* **2008**, 74 (23), 7152-7162.
- [65] Chait, B. T., „Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down?", *Science* **2006**, 314 (5796), 65-66.
- [66] Righetti, P. G., „Electrophoresis: the march of pennies, the march of dimes", *J Chromatogr A* **2005**, 1079 (1-2), 24-40.
- [67] Switzer, R. C., 3rd, Merril, C. R., Shifrin, S., „A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels", *Anal Biochem* **1979**, 98 (1), 231-237.

- [68] Butt, R. H., Coorssen, J. R., „Coomassie blue as a near-infrared fluorescent stain: a systematic comparison with Sypro Ruby for in-gel protein detection", *Mol Cell Proteomics* **2013**, 12 (12), 3834-3850.
- [69] Kurien, B. T., Scofield, R. H., „Extraction of proteins from gels: a brief review", *Methods Mol Biol* **2012**, 869, 403-405.
- [70] Olsen, J. V., Ong, S. E., Mann, M., „Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues", *Mol Cell Proteomics* **2004**, 3 (6), 608-614.
- [71] Majors, R. E., „Historical Developments in HPLC and UHPLC Column Technology: The Past 25 Years", *Lc Gc North America* **2015**, 33 (11), 818-+.
- [72] Ishihama, Y., „Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry", *J Chromatogr A* **2005**, 1067 (1-2), 73-83.
- [73] Taouatas, N., Altelaar, A. F., Drugan, M. M., Helbig, A. O., Mohammed, S., Heck, A. J., „Strong cation exchange-based fractionation of Lys-N-generated peptides facilitates the targeted analysis of post-translational modifications", *Mol Cell Proteomics* **2009**, 8 (1), 190-200.
- [74] Wang, Y., et al., „Reversed-phase chromatography with multiple fraction concatenation strategy for proteome profiling of human MCF10A cells", *Proteomics* **2011**, 11 (10), 2019-2026.
- [75] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., „Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53-68.
- [76] Kebarle, P., Verkerk, U. H., „Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now", *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, 28 (6), 898-917.
- [77] Ammann, A. A., „Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool", *J Mass Spectrom* **2007**, 42 (4), 419-427.
- [78] Luong, E. T., Houk, R. S., „Determination of carbon isotope ratios in amino acids, proteins, and oligosaccharides by inductively coupled plasma-mass spectrometry", *J Am Soc Mass Spectrom* **2003**, 14 (4), 295-301.
- [79] Sussulini, A., Becker, J. S., „Combination of PAGE and LA-ICP-MS as an analytical workflow in metallomics: state of the art, new quantification strategies, advantages and limitations", *Metallomics* **2011**, 3 (12), 1271-1279.
- [80] Konz, I., Fernandez, B., Fernandez, M. L., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., „Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications", *Anal Bioanal Chem* **2012**, 403 (8), 2113-2125.
- [81] Esteban-Fernandez, D., Bierkandt, F. S., Linscheid, M. W., „MeCAT labeling for absolute quantification of intact proteins using label-specific isotope dilution ICP-MS", *J Anal At Spectrom* **2012**, 27 (10), 1701-1708.
- [82] Bradshaw, N., Hall, E. F. H., Sanderson, N. E., „Inductively Coupled Plasma as an Ion-Source for High-Resolution Mass-Spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1989**, 4 (8), 801-803.
- [83] Zubarev, R. A., Makarov, A., „Orbitrap mass spectrometry", *Anal Chem* **2013**, 85 (11), 5288-5296.
- [84] Wells, J. M., McLuckey, S. A., „Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins", *Methods Enzymol* **2005**, 402, 148-185.
- [85] Biemann, K., „Mass spectrometry of peptides and proteins", *Annu Rev Biochem* **1992**, 61, 977-1010.

- [86] Roepstorff, P., Fohlman, J., „*Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*”, *Biomed Mass Spectrom* **1984**, 11 (11), 601.
- [87] Tran, N. H., Zhang, X., Xin, L., Shan, B., Li, M., „*De novo peptide sequencing by deep learning*”, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**.
- [88] The UniProt, C., „*UniProt: the universal protein knowledgebase*”, *Nucleic Acids Res* **2017**, 45 (D1), D158-D169.
- [89] Sadygov, R. G., Cociorva, D., Yates, J. R., 3rd, „*Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book*”, *Nat Methods* **2004**, 1 (3), 195-202.
- [90] Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S., „*Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*”, *Electrophoresis* **1999**, 20 (18), 3551-3567.
- [91] Eng, J. K., McCormack, A. L., Yates, J. R., „*An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database*”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, 5 (11), 976-989.
- [92] Lindemann, C., Thomanek, N., Hundt, F., Lerari, T., Meyer, H. E., Wolters, D., Marcus, K., „*Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics*”, *Biol Chem* **2017**, 398 (5-6), 687-699.
- [93] Weisser, H., et al., „*An automated pipeline for high-throughput label-free quantitative proteomics*”, *J Proteome Res* **2013**, 12 (4), 1628-1644.
- [94] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., „*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*”, *Mol Cell Proteomics* **2002**, 1 (5), 376-386.
- [95] Chahrour, O., Cobice, D., Malone, J., „*Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics*”, *J Pharm Biomed Anal* **2015**, 113, 2-20.
- [96] Lewandowska, D., ten Have, S., Hodge, K., Tillemans, V., Lamond, A. I., Brown, J. W., „*Plant SILAC: stable-isotope labelling with amino acids of arabidopsis seedlings for quantitative proteomics*”, *PLoS One* **2013**, 8 (8), e72207.
- [97] Sury, M. D., Chen, J. X., Selbach, M., „*The SILAC fly allows for accurate protein quantification in vivo*”, *Mol Cell Proteomics* **2010**, 9 (10), 2173-2183.
- [98] Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievensen, I., Lubner, C. A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fassler, R., Mann, M., „*SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function*”, *Cell* **2008**, 134 (2), 353-364.
- [99] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R., „*Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*”, *Nature Biotechnology* **1999**, 17 (10), 994-999.
- [100] Ross, P. L., et al., „*Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents*”, *Mol Cell Proteomics* **2004**, 3 (12), 1154-1169.
- [101] Schmidt, A., Kellermann, J., Lottspeich, F., „*A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels*”, *Proteomics* **2005**, 5 (1), 4-15.
- [102] Ahrends, R., Pieper, S., Kuhn, A., Weisshoff, H., Hamester, M., Lindemann, T., Scheler, C., Lehmann, K., Taubner, K., Linscheid, M. W., „*A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics*”, *Mol Cell Proteomics* **2007**, 6 (11), 1907-1916.

- [103] El-Khatib, A. H., Esteban-Fernandez, D., Linscheid, M. W., „Dual labeling of biomolecules using MeCAT and DOTA derivatives: application to quantitative proteomics", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, 403 (8), 2255-2267.
- [104] El-Khatib, A. H., Esteban-Fernandez, D., Linscheid, M. W., „Inductively coupled plasma mass spectrometry-based method for the specific quantification of sulfenic acid in peptides and proteins", *Anal Chem* **2014**, 86 (4), 1943-1948.
- [105] Schwarz, G., Beck, S., Weller, M. G., Linscheid, M. W., „MeCAT--new iodoacetamide reagents for metal labeling of proteins and peptides", *Anal Bioanal Chem* **2011**, 401 (4), 1203-1209.
- [106] Pasha, A., Lin, M., Tircso, G., Rostollan, C. L., Woods, M., Kiefer, G. E., Sherry, A. D., Sun, X., „Synthesis and evaluation of lanthanide ion DOTA-tetraamide complexes bearing peripheral hydroxyl groups", *J Biol Inorg Chem* **2009**, 14 (3), 421-438.
- [107] Schwarz, G., Mueller, L., Beck, S., Linscheid, M. W., „DOTA based metal labels for protein quantification: a review", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2014**, 29 (2), 221-233.
- [108] Becker, R., „Substratscreening mit MeCAT - Ein Vergleich von Strategien zur relativen Proteinquantifizierung", Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2013**.
- [109] Ron, E. Z., Kohler, R. E., Davis, B. D., „Polysomes extracted from *Escherichia coli* by freeze-thaw-lysozyme lysis", *Science* **1966**, 153 (3740), 1119-1120.
- [110] EMBL, „Protein Purification - Extraction and Clarification", (letzter Zugriff: 11.12.2017), https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/index.html.
- [111] Heilmann, H. D., „On the peptidoglycan of the cell walls of *Pseudomonas aeruginosa*", *Eur J Biochem* **1972**, 31 (3), 456-463.
- [112] GESTIS-Stoffdatenbank, „Eintrag zu Natriumtetraborat", (letzter Zugriff: 28.02.2018), [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001820.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001820.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0).
- [113] Schwarz, G., „MeCAT-IA – Ein neuartiges Reagenz zur molekular- und elementmassenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen", Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2013**.
- [114] Laemmli, U. K., Favre, M., „Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events", *J Mol Biol* **1973**, 80 (4), 575-599.
- [115] GESTIS-Stoffdatenbank, „Eintrag zu Butanon", (letzter Zugriff: 28.02.2018), [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001820.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001820.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0).
- [116] GESTIS-Stoffdatenbank, „Eintrag zu 3-Pentanon", (letzter Zugriff: 28.02.2018), [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001820.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/001820.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0).
- [117] Ahrends, R., „MeCAT - Neue Wege in der Peptid- und Proteinquantifizierung", Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2009**.
- [118] Miseta, A., Csutora, P., „Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms", *Mol Biol Evol* **2000**, 17 (8), 1232-1239.
- [119] Pieper, S., „Metallchelatkompexe für die elementmassenspektrometrische Quantifizierung von Peptiden und Proteinen", Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2008**.
- [120] Leroy, B., Rosier, C., Erculisse, V., Leys, N., Mergeay, M., Wattiez, R., „Differential proteomic analysis using isotope-coded protein-labeling strategies: comparison,

- improvements and application to simulated microgravity effect on *Cupriavidus metallidurans* CH34", *Proteomics* **2010**, 10 (12), 2281-2291.
- [121] Van den Toorn, H. W., Mohammed, S., Gouw, J. W., Van Breukelen, B., Heck, A. J., „Targeted SCX Based Peptide Fractionation for Optimal Sequencing by Collision Induced, and Electron Transfer Dissociation", *J Proteomics Bioinform* **2008**, 1 (8), 379-388.
- [122] Jurkevitch, E., et al., unveröffentlichte Daten.
- [123] Cover, W. H., Martinez, R. J., Rittenberg, S. C., „Permeability of the boundary layers of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J and its bdelloplasts to small hydrophilic molecules", *J Bacteriol* **1984**, 157 (2), 385-390.
- [124] Welch, B. L., „The generalisation of student's problems when several different population variances are involved", *Biometrika* **1947**, 34 (1-2), 28-35.
- [125] Filliben, J. J., „The Probability Plot Correlation Coefficient Test for Normality", *Technometrics* **1975**, 17 (1), 111-117.
- [126] Blom, G., Wiley, New York, **1958**.
- [127] „Proteome Discoverer Version 1.4 - User Guide", Revision A, Thermo Fischer Scientific, **Dezember 2012**.
- [128] Ashburner, M., et al., „Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium", *Nat Genet* **2000**, 25 (1), 25-29.
- [129] The Gene Ontology, C., „Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources", *Nucleic Acids Res* **2017**, 45 (D1), D331-D338.
- [130] Mikosch, J., Trippel, S., Eichhorn, C., Otto, R., Lourderaj, U., Zhang, J. X., Hase, W. L., Weidemuller, M., Wester, R., „Imaging nucleophilic substitution dynamics", *Science* **2008**, 319 (5860), 183-186.
- [131] Benda, D., Schwarz, G., Beck, S., Linscheid, M. W., „Quantification of intact covalently metal labeled proteins using ESI-MS/MS", *J Mass Spectrom* **2014**, 49 (1), 13-18.
- [132] Heimerl, J., „Entwicklung und Validierung von neuen Strategien für die quantitative Analyse von Proteinen", Bachelorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2015**.
- [133] Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., Zhou, B., „Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges", *Bioinform Biol Insights* **2015**, 9 (Suppl 1), 29-46.
- [134] Mallick, H., Ma, S., Franzosa, E. A., Vatanen, T., Morgan, X. C., Huttenhower, C., „Experimental design and quantitative analysis of microbial community multiomics", *Genome Biol* **2017**, 18 (1), 228.
- [135] Sun, Y. V., Hu, Y. J., „Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases", *Adv Genet* **2016**, 93, 147-190.
- [136] Hampton, A., Slotin, L. A., Chawla, R. R., „Evidence for species-specific substrate-site-directed inactivation of rabbit adenylate kinase by N6-(6-iodoacetamido-n-hexyl)adenosine 5'-triphosphate", *J Med Chem* **1976**, 19 (11), 1279-1283.
- [137] Bradford, M. M., „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.
- [138] Becker, R., Schwarz, G., Beck, S., Linscheid, M. W., „Software assisted data analysis for relative quantification of differentially metal labeled proteins based on HPLC/ESI-MS and -MS/MS experiments", *J Mass Spectrom* **2015**, 50 (10), 1120-1123.

8 Anhang

Tab A1: Quantifizierte Proteine von *B. bacteriovorus* HD100 des ersten Probensatzes (Kapitel 3.5). Es wurden nur Proteine berücksichtigt, für die alle Quantifizierungskanäle vorhanden waren. Die farbig unterlegten Quantifizierungswerte basieren auf Quantifizierungswerten von mehreren Replikaten.

Genlokus	Accession	Beschreibung	GP1h/AP	GP2h/GP1h	GP3h/GP2h
Bd0022	Q6MRQ2	Electron transfer flavoprotein beta-subunit GN=etfB	2,726	0,487	1,006
Bd0046	Q6MRM9	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase GN=dapA	10,694	0,061	1,195
Bd0063	Q6MRL4	Uncharacterized protein GN=Bd0063	0,948	0,367	1,099
Bd0077	Q6MRK1	Serine--tRNA ligase GN=serS	0,757	1,254	29,991
Bd0082	Q6MRJ7	Uncharacterized protein GN=Bd0082	0,871	0,305	15,857
Bd0112	Q6MRH2	Putative pilus assembly membrane protein GN=PilQ	1,706	0,403	1,204
Bd0121	Q6MRG4	Chemotaxis protein GN=Bd0121	91,452	0,618	0,827
Bd0156	Q6MRD2	Nitrogen fixation specific regulatory protein NifA GN=nifA	2,613	0,847	0,486
Bd0162	Q6MRC6	Large-conductance mechanosensitive channel GN=mscL	2,615	0,630	2,641
Bd0163	Q6MRC5	YdiY protein GN=ydiY	0,371	0,923	1,696
Bd0180	Q6MRB1	TonB-like protein GN=Bd0180	0,984	0,287	1,842
Bd0182	Q6MRA9	Adventurous gliding motility protein X GN=aglX	6,161	0,809	1,116
Bd0208	Q6MR87	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase GN=glpD	0,855	2,922	0,729
Bd0223	Q6MR75	Putative regulator for granula-associated protein GN=Bd0223	80,452	2,877	0,828
Bd0235	Q6MR64	ATP-dependent RNA helicase GN=rhlE	3,323	1,290	1,185
Bd0293	Q6MR08	Uncharacterized protein GN=Bd0293	2,565	0,410	1,216
Bd0294	Q6MR07	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein GN=Bd0294	20,294	0,731	0,777
Bd0339	Q6MQW4	RNA-binding protein GN=rbp	3,177	0,961	2,137
Bd0356	Q6MQV0	Putative arginase GN=Bd0356	2,668	1,384	1,879
Bd0367	Q6MQU2	Two component response regulator GN=pleD	3,629	1,054	4,562
Bd0401	Q6MQQ9	Uncharacterized protein GN=Bd0401	265,065	0,815	1,143
Bd0425	Q6MQN6	Uncharacterized protein GN=Bd0425	5,516	0,047	24,134
Bd0427	Q6MQN4	Uncharacterized protein GN=Bd0427	0,387	0,585	0,690
Bd0452	Q6MQL3	Oxidoreductase GN=Bd0452	6,065	1,459	0,948
Bd0458	Q6MQK8	Valine--tRNA ligase GN=valS	39,589	0,665	1,458
Bd0459	Q6MQK7	Uncharacterized protein GN=Bd0459	1,421	0,169	1,224
Bd0478	Q6MQI8	TonB system transport protein ExbD2 GN=tolR	0,387	1,079	1,489
Bd0498	Q6MQH0	Uncharacterized protein GN=Bd0498	0,597	1,427	4,679
Bd0545	Q6MQC9	DNA recombination protein rmuC GN=Bd0545	73,694	0,608	2,556
Bd0574	Q6MQA4	Uncharacterized protein GN=Bd0574	2,919	0,455	2,924
Bd0585	Q6MQ94	D-alanine--D-alanine ligase GN=ddl	1,378	0,601	7,609
Bd0586	Q6MQ93	Enhancing lycopene biosynthesis protein 2 GN=elb	2,663	0,962	0,756
Bd0604	Q6MQ77	Flagellin GN=hag	0,668	0,198	1,778

Bd0625	Q6MQ58	Uncharacterized protein GN=Bd0625	1,129	9,129	0,073
Bd0675	Q6MQ12	Uncharacterized protein GN=Bd0675	26,194	0,182	2,161
Bd0700	Q6MPY8	Predicted Zn-dependent protease GN=Bd0700	6,726	0,033	6,748
Bd0711	Q6MPX7	Integration host factor subunit beta GN=Bd0711	0,726	24,720	0,015
Bd0742	Q6MPU8	GGDEF domain protein GN=Bd0742	3,952	0,804	1,030
Bd0762	Q6MPS9	MaoC family protein GN=maoC	0,661	1,106	6,310
Bd0786	Q6MPQ9	Uncharacterized protein GN=Bd0786	2,387	0,676	19,307
Bd0790	Q6MPQ7	Uncharacterized protein GN=Bd0790	0,903	0,976	0,222
Bd0792	Q6MPQ5	Uncharacterized protein GN=Bd0792	6,694	0,312	2,173
Bd0838	Q6MPL2	Adventurous gliding motility protein S GN=aglS	1,145	0,986	18,717
Bd0843	Q6MPK9	RNA polymerase sigma-54 factor GN=rpoN	1,210	1,044	6,419
Bd0857	Q6MPJ6	Uncharacterized protein GN=Bd0857	1,016	2,613	1,830
Bd0859	Q6MPJ4	Alkylphosphonate ABC transporter GN=phoD	2,032	0,309	5,356
Bd0964	Q6MP96	DNA topoisomerase 1 GN=topA	0,582	564,035	0,003
Bd0974	Q6MP89	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase GN=Bd0974	3,977	0,307	2,444
Bd1047	Q6MP21	Uncharacterized protein GN=Bd1047	8,919	1,316	0,702
Bd1054	Q6MP15	Asparagine--tRNA ligase GN=asnS	6,512	0,609	0,784
Bd1184	Q6MNQ6	Uncharacterized protein GN=Bd1184	0,371	6,520	12,426
Bd1189	Q6MNQ2	Tyrosine--tRNA ligase GN=tyrS	2,476	0,392	1,204
Bd1190	Q6MNQ1	Uncharacterized protein GN=Bd1190	1,965	3,574	0,185
Bd1221	Q6MNM5	ABC-type dipeptide transport system, ATPase component GN=dppD	0,823	3,099	1,012
Bd1306	Q6MNF1	Acetyl-coenzyme A synthetase GN=acsA	5,172	0,551	0,919
Bd1350	Q6MNB0	Uncharacterized protein GN=Bd1350	3,500	0,939	1,736
Bd1412	Q6MN50	ATP-dependent RNA helicase GN=deaD	6,161	1,264	1,024
Bd1460	Q6MN06	Adenylosuccinate synthetase GN=purA	4,194	0,250	2,508
Bd1467	Q6MMZ9	30S ribosomal protein S20 GN=rpsT	1,392	1,063	0,196
Bd1491	Q6MMY0	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD GN=lolD	27,000	0,635	1,125
Bd1507	Q6MMW6	Riboflavin biosynthesis protein GN=ribC	4,726	0,776	0,994
Bd1509	Q6MMW4	Type IV pilus biogenesis protein PilB GN=pilB	2,687	0,379	3,359
Bd1542	Q6MMT1	Uncharacterized protein GN=Bd1542	3,806	1,620	0,675
Bd1548	Q6MMS5	Ribosome-binding factor A GN=rbfA	0,855	4,474	1,112
Bd1597	Q6MMM9	General secretion pathway protein D GN=gspD	0,612	0,109	16,711
Bd1606	Q6MMM1	Probable cytochrome C-type biogenesis protein GN=Bd1606	4,966	0,189	3,170
Bd1608	Q6MML9	Molybdopterine oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit GN=hmoA	2,747	0,879	1,754
Bd1609	Q6MML8	Molybdopterine oxidoreductase GN=Bd1609	0,919	0,408	7,997
Bd1612	Q6MML5	Putative molybdopterine oxidoreductase GN=Bd1612	5,613	0,594	1,565
Bd1775	Q6MM68	DapD protein GN=dapD	0,339	1,888	0,371
Bd1797	Q6MM47	Uncharacterized protein GN=Bd1797	8,694	0,226	0,699
Bd1825	Q6MM23	Chemotaxis protein CheY GN=cheY	1,081	0,218	5,848
Bd1835	Q6MM13	Acetyl-CoA acyltransferase GN=Bd1835	1,282	0,396	5,027

Bd1870	Q6MLY3	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase GN=rfbA	3,645	0,401	2,000
Bd1944	Q6MLR3	GTPase Der GN=engA	3,419	0,842	1,562
Bd1946	Q6MLR1	Uncharacterized protein GN=Bd1946	1,952	0,214	1,356
Bd1952	Q6MLQ5	Mpl protein GN=mpl	10,895	0,193	4,334
Bd1967	Q6MLP0	Pseudouridylate synthase GN=rsuA2	1,581	0,571	6,450
Bd1972	Q6MLN5	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems GN=oppA	25,145	0,842	0,502
Bd2001	Q6MLK7	YCE I like family protein GN=Bd2001	2,680	0,851	1,173
Bd2005	Q6MLK3	Uncharacterized protein GN=Bd2005	13,820	1,206	1,411
Bd2007	Q6MLK1	Serine hydroxymethyltransferase GN=glyA	4,097	0,298	1,307
Bd2054	Q6MLF7	Uncharacterized protein GN=Bd2054	3,659	0,544	1,392
Bd2077	Q6MLD5	Uncharacterized protein GN=Bd2077	31,968	0,132	5,134
Bd2080	Q6MLD2	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] GN=guaA	7,548	0,970	1,079
Bd2123	Q6ML93	Signal recognition particle protein GN=srp54	14,790	0,348	2,009
Bd2130	Q6ML87	Peptide chain release factor 3 GN=prfC	3,403	0,825	1,514
Bd2156	Q6ML62	2-nitropropane dioxygenase GN=Bd2156	0,500	2,430	0,392
Bd2166	Q6ML54	Ribonuclease Y 2 GN=rny2	20,307	0,624	2,699
Bd2175	Q6ML46	Uncharacterized protein GN=Bd2175	0,770	1,174	6,088
Bd2212	Q6ML11	Uncharacterized protein GN=Bd2212	3,107	0,613	1,302
Bd2255	P61653	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase GN=kdsA	2,742	0,649	3,149
Bd2257	Q6MKX0	Isoleucine--tRNA ligase GN=ileS	9,694	0,132	0,681
Bd2279	Q6MKU9	Alpha-amylase GN=malA	9,468	0,263	0,954
Bd2304	Q6MKS9	Band 7 protein GN=Bd2304	1,613	0,654	8,438
Bd2360	Q6MKM8	Uncharacterized protein GN=Bd2360	1,468	0,412	0,960
Bd2383	Q6MKK5	Uncharacterized protein GN=Bd2383	14,435	0,117	1,769
Bd2436	Q6MKF8	Uncharacterized protein GN=Bd2436	2,177	0,366	0,547
Bd2464	Q6MKD5	Uncharacterized protein GN=Bd2464	56,419	0,008	3,705
Bd2494	Q6MKB2	Uncharacterized protein GN=Bd2494	2,468	3,300	0,103
Bd2502	Q6MKA5	2-methylisocitrate lyase GN=prpB	0,472	0,511	5,578
Bd2533	Q6MK77	Uncharacterized protein GN=Bd2533	3,065	0,773	1,477
Bd2547	Q6MK64	Uncharacterized protein GN=Bd2547	30,129	0,643	1,815
Bd2577	Q6MK36	Uncharacterized protein GN=Bd2577	6,915	0,694	3,317
Bd2606	Q6MK10	Probable signal peptide GN=Bd2606	3,597	0,465	0,353
Bd2673	Q6MJU5	Uncharacterized protein GN=Bd2673	0,371	0,353	1,009
Bd2675	Q6MJU3	Putative membrane protein with protease subunit GN=Bd2675	2,987	0,710	3,191
Bd2680	Q6MJT8	Uncharacterized protein GN=Bd2680	2,516	0,378	4,921
Bd2687	Q6MJT1	Uncharacterized protein GN=Bd2687	9,598	0,285	3,939
Bd2688	Q6MJT0	Dihydroorotase GN=pyrC	3,952	0,377	1,705
Bd2692	Q6MJS6	Protease GN=Bd2692	1,597	0,063	1,049
Bd2694	P60936	Undecaprenyl-diphosphatase GN=uppP	119,774	0,865	1,638
Bd2704	Q6MJR5	Ribose-phosphate pyrophosphokinase GN=prs	2,724	0,906	1,383
Bd2707	Q6MJR2	Ribosome-binding ATPase YchF GN=yhfF	1,494	0,996	5,129
Bd2726	Q6MJP4	Uncharacterized protein GN=Bd2726	1,820	0,315	3,209
Bd2727	Q6MJP3	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA	151,726	0,800	1,047
Bd2751	Q6MJM2	Urocanate hydratase GN=hutU	5,737	0,590	1,623
Bd2762	Q6MJL3	NadC protein GN=nadC	3,016	0,313	2,070

Bd2769	Q6MJK7	Putative outer membrane protein GN=yiaD	5,879	0,390	3,410
Bd2825	Q6MJF3	Cytochrome c-552 GN=nrfA	2,581	0,464	1,535
Bd2831	Q6MJE7	Methyl-accepting chemotaxis protein GN=mcpA	2,583	0,917	0,362
Bd2834	Q6MJE4	NAD-dependent malic enzyme GN=maeA	23,887	0,599	1,745
Bd2890	Q6MJ93	Oxidoreductase GN=Bd2890	1,629	3,616	1,881
Bd2893	Q6MJ90	Transcriptional regulator GN=dctD	0,419	2,745	1,456
Bd2950	Q6MJ36	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha GN=rpoA	2,706	0,979	1,710
Bd2955	Q6MJ32	Protein translocase subunit SecY GN=secY	2,484	0,405	1,565
Bd2972	Q6MJ18	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	18,323	0,636	1,264
Bd3000	Q6MIZ4	Uncharacterized protein GN=Bd3000	3,113	1,025	1,152
Bd3020	Q6MIX5	Flagellar motor protein MotB GN=motB	44,145	0,845	1,336
Bd3035	Q6MIW1	Nitrogen assimilation regulatory protein NtrX GN=ntrX	4,500	0,868	0,912
Bd3044	Q6MIV3	Uncharacterized protein GN=Bd3044	3,161	0,792	0,632
Bd3048	Q6MIV0	Chaperone protein ClpB GN=clpB	36,100	0,561	0,488
Bd3052	Q6MIU6	Flagellin GN=flgL	1,999	0,455	4,910
Bd3058	Q6MIU0	Efflux transporter GN=noIG	2,919	0,905	1,746
Bd3080	Q6MIR9	NADH-quinone oxidoreductase subunit I GN=nuoI	2,792	0,718	0,587
Bd3081	Q6MIR8	NADH dehydrogenase I chain G GN=nuoG	2,048	0,405	1,492
Bd3092	Q6MIQ9	Methyl-accepting chemotaxis protein GN=Bd3092	6,548	0,477	0,380
Bd3137	Q6MIL8	Uncharacterized protein GN=Bd3137	5,912	0,695	0,462
Bd3178	Q6MIH9	Aconitate hydratase GN=acnA	6,264	0,957	0,893
Bd3196	P61676	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase GN=murC	5,823	1,282	0,505
Bd3237	Q6MIC7	Glutathione S-transferase family protein GN=gst	1,274	1,298	11,188
Bd3264	Q6MIA3	Putative pseudouridylate synthase GN=Bd3264	4,597	0,262	1,805
Bd3311	Q6MI59	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase GN=aspS	1,952	0,401	1,620
Bd3312	Q6MI58	Uncharacterized protein GN=Bd3312	3,984	0,534	9,495
Bd3367	Q6MI13	Conserved sensor histidine kinase GN=Bd3367	1,935	0,224	5,283
Bd3389	Q6MHZ5	Branched-chain amino acid transport system ATP-binding protein GN=livF	2,290	0,317	1,283
Bd3395	Q6MHY9	Flagellar hook protein FlgE GN=flgE	4,371	0,040	0,407
Bd3424	Q6MHW0	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] GN=glmS	7,355	0,945	1,420
Bd3460	Q6MHS9	Uncharacterized protein GN=Bd3460	6,048	1,318	1,337
Bd3478	Q6MHR2	Ggt protein GN=ggt	30,613	0,095	1,365
Bd3480	Q6MHR0	Proline iminopeptidase GN=pip	11,677	0,224	1,511
Bd3489	Q6MHQ1	Uncharacterized protein GN=Bd3489	0,097	0,730	1,289
Bd3532	Q6MHK9	Uncharacterized protein GN=Bd3532	1,242	0,387	1,518
Bd3578	Q6MHG7	Pyruvate carboxylase GN=Bd3578	13,242	0,091	1,334
Bd3617	Q6MHD3	Superoxide dismutase GN=sodB	2,795	0,887	0,789
Bd3622	Q6MHC8	Aminopeptidase GN=Bd3622	36,742	0,050	17,489
Bd3667	Q6MH87	Uncharacterized protein GN=Bd3667	1,726	0,267	10,909
Bd3702	Q6MH56	Uncharacterized protein GN=Bd3702	7,790	1,567	1,131

Bd3749	Q6MH16	Lon protease GN=lon	4,159	0,825	1,125
Bd3861	Q6MGR3	Pyruvate carboxylase GN=Bd3861	2,661	0,583	1,231
Bd3876	Q6MGP8	Lon protease 2 GN=lon2	3,629	10,869	0,131
Bd3897	Q6MGM7	ATP synthase subunit beta GN=atpD	2,922	1,043	1,308

Tab A2: Quantifizierte Proteine von *B. bacteriovorus* HD100 des zweiten Probensatzes (Kapitel 3.6). Es wurden nur Proteine berücksichtigt, für die alle Quantifizierungskanäle vorhanden waren. Die farbig unterlegten Quantifizierungswerte basieren auf Quantifizierungswerten von mehreren Replikaten.

Genlokus	Accession	Beschreibung	AP/APy	GP0.5h/AP	GP2h/GP0.5h
Bd0018	Q6MRQ6	Peptidylprolyl isomerase GN=ppiC	0,315	1,774	2,408
Bd0032	Q6MRP3	30S ribosomal protein S6 GN=rpsF	4,176	0,781	1,047
Bd0063	Q6MRL4	Uncharacterized protein GN=Bd0063	0,214	0,880	1,027
Bd0097	Q6MRI2	10 kDa chaperonin GN=groS	5,262	0,596	1,932
Bd0099	Q6MRI1	60 kDa chaperonin GN=groL	5,961	0,796	1,882
Bd0112	Q6MRH2	Putative pilus assembly transmembrane protein GN=PilQ	0,413	0,696	1,018
Bd0121	Q6MRG4	Chemotaxis protein GN=Bd0121	2,725	34,026	1,413
Bd0125	Q6MRG1	Outer membrane protein assembly factor BamD GN=comL	0,522	2,117	5,475
Bd0158	Q6MRD0	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein GN=ygaD	0,387	2,765	0,656
Bd0160	Q6MRC8	Penicillin-binding protein 1A GN=mrca	0,364	0,879	1,180
Bd0161	Q6MRC7	Uncharacterized protein GN=Bd0161	9,288	0,135	1,815
Bd0163	Q6MRC5	YdiY protein GN=ydiY	0,120	4,587	2,878
Bd0187	Q6MRA5	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit SufC GN=sufC	2,369	1,562	2,264
Bd0202	Q6MR92	Aminopeptidase P GN=pepP	0,435	5,393	0,401
Bd0208	Q6MR87	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase GN=glpD	0,861	0,180	85,822
Bd0209	Q6MR86	Putative hemagglutinin/hemolysin-related protein GN=Bd0209	0,828	7,297	1,239
Bd0225	Q6MR73	Uncharacterized protein GN=Bd0225	209,822	9,676	6,103
Bd0231	Q6MR68	Putative sporulation protein R GN=Bd0231	2,874	3,417	1,846
Bd0240	Q6MR59	Uncharacterized protein GN=Bd0240	3,110	0,707	2,569
Bd0267	Q6MR33	Glutamine synthetase GN=glnA	1,293	3,785	0,552
Bd0287	Q6MR14	Cytochrome c oxidase subunit 1 GN=ctaD	3,193	1,639	1,761
Bd0316	Q6MQY6	ATP-dependent RNA helicase GN=rhlE	1,325	3,792	1,794
Bd0336	Q6MQW6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GN=slyD	8,593	0,387	1,164
Bd0339	Q6MQW4	RNA-binding protein GN=rbp	7,872	0,627	0,882
Bd0344	Q6MQW0	Threonylcarbamoyl-AMP synthase GN=Bd0344	0,201	2,922	1,019
Bd0365	Q6MQU3	Leucine--tRNA ligase GN=leuS	0,878	0,820	61,012
Bd0397	Q6MQR3	Protein phosphatase GN=Bd0397	0,628	5,151	0,360
Bd0408	Q6MQQ2	Flagellin GN=flaA	0,174	1,999	1,176
Bd0425	Q6MQN6	Uncharacterized protein GN=Bd0425	1,538	0,266	1,936
Bd0491	Q6MQH6	tRNA pseudouridine synthase A GN=truA	0,693	4,860	0,562
Bd0590	Q6MQ90	Putative ferredoxin GN=fer	5,262	1,366	1,050
Bd0604	Q6MQ77	Flagellin GN=hag	0,259	1,459	0,377
Bd0633	Q6MQ51	Peptidoglycan-associated lipoprotein GN=pal	0,507	0,159	1,081
Bd0635	Q6MQ49	Uncharacterized protein GN=Bd0635	0,482	3,406	6,595

Bd0644	Q6MQ41	Uncharacterized protein GN=Bd0644	0,404	13,217	1,050
Bd0646	Q6MQ39	Transcriptional regulator, MarR family GN=Bd0646	0,506	0,186	3,213
Bd0649	Q6MQ36	Methionine aminopeptidase GN=map	5,709	1,709	1,632
Bd0674	Q6MQ13	Uncharacterized protein GN=Bd0674	0,362	1,782	1,080
Bd0692	Q6MPZ6	Glycine dehydrogenase (decarboxylating) GN=gcvP	3,095	0,896	2,091
Bd0704	Q6MPY4	Cell wall surface anchor family protein GN=Bd0704	1,998	3,937	1,230
Bd0720	Q6MPW9	ADP-heptose synthase GN=rfaE	0,238	15,516	0,629
Bd0766	Q6MPS6	Octanoyltransferase GN=lipB	0,717	14,725	0,485
Bd0796	Q6MPQ2	Enolase GN=eno	5,789	3,819	8,390
Bd0833	Q6MPL6	Adventurous gliding motility protein T GN=aglT	0,191	3,745	0,348
Bd0838	Q6MPL2	Adventurous gliding motility protein S GN=aglS	0,207	1,297	0,354
Bd0859	Q6MPJ4	Alkylphosphonate ABC transporter GN=phoD	0,563	4,211	1,871
Bd0888	Q6MPG6	Acriflavin resistance protein GN=acrF	0,593	1,106	5,727
Bd0959	Q6MPA0	Putative inactivated Zn-dependent peptidase, PMBA ortholog GN=pmbA	5,952	0,452	1,816
Bd0974	Q6MP89	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase GN=Bd0974	0,373	2,525	0,500
Bd0992	Q6MP72	Probable cell wall hydrolase GN=cwlJ	0,094	6,761	0,345
Bd1026	Q6MP40	Uncharacterized protein GN=Bd1026	0,393	4,452	0,192
Bd1027	Q6MP39	Galactokinase GN=lmbP	1,093	0,259	4,010
Bd1072	Q6MP00	Uncharacterized protein GN=Bd1072	4,527	0,582	2,295
Bd1077	Q6MNZ5	Protease GN=Bd1077	2,806	0,230	2,051
Bd1104	Q6MNX3	Uncharacterized protein GN=Bd1104	0,209	3,687	0,342
Bd1110	Q6MNX0	Uncharacterized protein GN=Bd1110	0,873	1,417	5,368
Bd1111	Q6MNW9	ABC-type antimicrobial peptide transporter, ATPase component GN=Bd1111	0,381	1,206	1,251
Bd1112	Q6MNW8	ABC-type antimicrobial peptide transporter, permease component GN=Bd1112	0,923	5,439	0,636
Bd1116	Q6MNW4	Adenylate cyclase GN=cyaA	0,684	0,812	5,246
Bd1184	Q6MNQ6	Uncharacterized protein GN=Bd1184	2,543	3,326	1,550
Bd1196	Q6MNP6	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase GN=nrdJ	0,386	9,847	0,568
Bd1230	Q6MNL8	Maltoporin GN=lmbB	0,325	2,306	2,161
Bd1251	Q6MNK1	Bifunctional protein PutA GN=putA	0,896	0,587	5,081
Bd1257	Q6MNJ6	Uncharacterized protein GN=Bd1257	0,221	2,515	41,954
Bd1287	Q6MNG9	Protease HtpX homolog GN=htpX	0,418	3,745	1,306
Bd1298	Q6MNF8	Chaperone protein DnaK GN=dnaK	2,472	1,955	2,204
Bd1319	Q6MND9	Uncharacterized protein GN=Bd1319	0,876	8,248	0,165
Bd1320	Q6MND8	Uncharacterized protein GN=Bd1320	2,457	0,271	1,155
Bd1332	Q6MNC7	ABC transporter, ATP-binding protein GN=Bd1332	3,882	0,838	0,760
Bd1340	Q6MNB9	Putative methyl accepting chemotaxis protein GN=Bd1340	1,449	0,657	5,650
Bd1394	Q6MN67	ATP-dependent RNA helicase GN=dbpA	8,435	61,163	0,049
Bd1412	Q6MN50	ATP-dependent RNA helicase GN=deaD	0,735	12,088	0,598
Bd1496	Q6MMX6	Oxidoreductase family protein GN=Bd1496	0,796	10,743	0,052

Bd1542	Q6MMT1	Uncharacterized protein GN=Bd1542	1,657	11,858	1,340
Bd1569	Q6MMQ7	DNA-directed RNA polymerase subunit omega GN=rpoZ	2,564	0,488	0,798
Bd1598	Q6MMM7	General secretion pathway protein C GN=gspC	2,550	3,513	0,915
Bd1604	Q6MMM2	Putative cytochrome c biogenesis protein GN=Bd1604	0,420	2,550	0,494
Bd1611	Q6MML6	Uncharacterized protein GN=Bd1611	4,077	0,684	1,026
Bd1624	Q6MMK4	50S ribosomal protein L35 GN=rpml	2,480	0,792	0,548
Bd1639	Q6MMJ0	Integration host factor subunit alpha GN=ihfA	0,241	0,758	1,813
Bd1661	Q6MMH0	Phosphate import ATP-binding protein PstB GN=pstB	0,385	2,016	0,999
Bd1687	Q6MME7	Uncharacterized protein GN=Bd1687	10,529	7,094	0,411
Bd1700	Q6MMD5	Nucleotide sugar epimerase/dehydratase GN=wbpM	0,379	1,682	2,454
Bd1705	Q6MMD1	Putative 2-nitropropane dioxygenase GN=Bd1705	0,028	5,731	202,878
Bd1710	Q6MMC6	Uncharacterized protein GN=Bd1710	0,393	4,090	1,842
Bd1797	Q6MM47	Uncharacterized protein GN=Bd1797	0,272	2,266	1,727
Bd1798	Q6MM46	NoIG efflux transporter GN=noIG	0,352	2,230	0,876
Bd1853	Q6MLZ8	Fused isobutyryl-CoA mutase GN=icmF	0,954	0,512	18,946
Bd1861	Q6MLZ2	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme GN=psd	1,264	2,616	6,216
Bd1863	Q6MLY9	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase GN=ygcM	0,533	4,533	0,430
Bd1885	Q6MLW8	Uncharacterized protein GN=Bd1885	10,112	0,488	2,469
Bd1891	Q6MLW2	NtrC family transcriptional regulator GN=Bd1891	43,040	7,162	2,890
Bd1904	Q6MLV0	Uncharacterized protein GN=Bd1904	0,705	9,585	1,183
Bd1931	Q6MLS4	Phosphoglucosamine mutase GN=glmM	1,777	1,739	0,156
Bd1932	Q3V7R4	Pyridoxine 5'-phosphate synthase GN=pdxJ	0,474	1,020	4,901
Bd1942	Q6MLR4	GTPase Era GN=era	3,364	3,548	0,742
Bd1952	Q6MLQ5	Mpl protein GN=mpl	3,886	1,344	0,653
Bd1964	P62033	Probable transcriptional regulatory protein Bd1964 GN=Bd1964	0,379	1,292	0,802
Bd1990	Q6MLL7	Putative auxin-regulated protein GN=Bd1990	0,018	9,902	33,965
Bd2005	Q6MLK3	Uncharacterized protein GN=Bd2005	1,120	24,091	2,771
Bd2015	Q6MLJ4	50S ribosomal protein L32 GN=rpmF	12,434	0,634	1,910
Bd2023	Q6MLI6	Uncharacterized protein GN=Bd2023	1,646	4,266	0,317
Bd2030	Q6MLI0	Uncharacterized protein GN=Bd2030	2,673	0,627	1,280
Bd2054	Q6MLF7	Uncharacterized protein GN=Bd2054	0,419	0,759	5,138
Bd2095	Q6MLB9	Probable acetyl-CoA acetyltransferase GN=Bd2095	5,858	0,239	0,462
Bd2117	Q6ML99	50S ribosomal protein L19 GN=rpIS	3,372	1,053	1,396
Bd2139	Q6ML78	Two-component response regulator GN=Bd2139	2,613	1,545	2,164
Bd2155	Q6ML63	Putative transcriptional regulator GN=Bd2155	0,107	7,859	0,732
Bd2175	Q6ML46	Uncharacterized protein GN=Bd2175	59,949	0,431	2,435
Bd2179	Q6ML42	Putative Rhs family protein GN=Bd2179	24,685	13,388	1,852
Bd2210	Q6ML13	Uncharacterized protein GN=Bd2210	0,337	1,426	1,062

Bd2218	Q6ML08	ATP-dependent protease La domain protein GN=lon	0,607	8,357	38,793
Bd2223	Q6ML03	Uncharacterized protein GN=Bd2223	0,319	13,009	0,229
Bd2226	Q6ML00	Cation efflux system protein, AcrB/AcrD/AcrF family protein GN=Bd2226	41,964	13,906	3,104
Bd2233	Q6MKZ3	Protein-export membrane protein SecF GN=secF	0,417	0,849	1,099
Bd2243	Q6MKY3	Uncharacterized protein GN=Bd2243	0,037	12,328	1,788
Bd2251	Q6MKX5	DegT/DnrJ/EryC1/StrS family protein GN=Bd2251	1,808	0,138	49,478
Bd2337	Q6MKQ0	Thiosulfate sulfurtransferase GN=sseA	0,724	0,510	20,208
Bd2338	Q6MKP9	Lysine--tRNA ligase GN=lysS	3,755	0,741	1,139
Bd2384	Q6MKK4	Uncharacterized protein GN=Bd2384	0,776	4,594	1,013
Bd2403	Q6MKI7	Uncharacterized protein GN=Bd2403	0,390	0,918	3,499
Bd2404	Q6MKI6	Sigma factor sigB regulation protein rsbU GN=rsbU	0,287	2,379	1,056
Bd2406	Q6MKI4	Chemotaxis histidine kinase GN=cheA	0,229	1,596	8,047
Bd2409	Q6MKI1	Chemotaxis response regulator CheY GN=cheY	0,939	1,457	7,513
Bd2417	Q6MKH5	Hydrolase, alpha/beta fold family GN=Bd2417	5,614	4,233	2,011
Bd2437	Q6MKF7	Phenol 2-monooxygenase GN=Bd2437	0,365	4,370	1,022
Bd2449	Q6MKE7	Cytidine deaminase GN=cdd	1,301	0,761	10,403
Bd2456	Q6MKE2	Uncharacterized protein GN=Bd2456	2,080	0,492	14,941
Bd2465	Q6MKD4	Uncharacterized protein GN=Bd2465	0,336	6,230	0,667
Bd2478	Q6MKC3	Alanine dehydrogenase GN=alaDH	8,269	0,423	1,312
Bd2485	Q6MKB9	Uncharacterized protein GN=Bd2485	0,724	1,760	0,095
Bd2491	Q6MKB4	Elongation factor P GN=efp	10,036	0,762	1,309
Bd2494	Q6MKB2	Uncharacterized protein GN=Bd2494	1,251	6,000	2,612
Bd2497	Q6MKA9	Uncharacterized protein GN=Bd2497	0,260	13,887	0,192
Bd2521	Q6MK88	PepN protein GN=pepN	8,351	0,656	2,310
Bd2524	Q6MK86	Uncharacterized protein GN=Bd2524	0,226	1,105	0,974
Bd2611	Q6MK05	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I GN=fixN	0,261	2,356	0,824
Bd2619	Q6MJZ8	Transcriptional regulator, LysR family GN=oxyR	0,840	2,084	0,101
Bd2626	Q6MJZ0	Uncharacterized protein GN=Bd2626	3,747	0,732	1,587
Bd2688	Q6MJT0	Dihydroorotase GN=pyrC	0,598	6,834	0,119
Bd2705	Q6MJR4	50S ribosomal protein L25 GN=rplY	6,681	0,780	1,478
Bd2715	Q6MJQ4	Uncharacterized protein GN=Bd2715	183,148	4,544	2,550
Bd2718	Q6MJQ2	Glycerol kinase GN=glpK	0,353	0,324	5,218
Bd2726	Q6MJP4	Uncharacterized protein GN=Bd2726	0,273	4,426	0,550
Bd2727	Q6MJP3	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase GN=gpmA	43,040	3,894	3,183
Bd2728	Q6MJP2	Oxoglutarate dehydrogenase GN=sucA	0,683	4,300	0,892
Bd2737	Q6MJN5	Uncharacterized protein GN=Bd2737	0,390	9,581	3,766
Bd2750	Q6MJM3	Putative solute-binding periplasmic protein of ABC transport GN=ssuA	0,287	1,869	1,907
Bd2751	Q6MJM2	Urocanate hydratase GN=hutU	1,393	0,462	5,504
Bd2761	Q6MJL4	Putative phosphate regulon protein GN=Bd2761	0,395	1,205	0,384
Bd2795	Q6MJI2	Uncharacterized protein GN=Bd2795	1,086	5,490	0,607
Bd2800	Q6MJH7	Serine protease MucD GN=algY	1,004	0,793	5,591

Bd2801	Q6MJH6	Putative septation protein SpoVG GN=spoVG	0,419	1,181	0,574
Bd2813	Q6MJG4	Putative alcohol dehydrogenase I GN=adh	2,821	0,485	9,341
Bd2831	Q6MJE7	Methyl-accepting chemotaxis protein GN=mcpA	0,381	2,204	0,174
Bd2834	Q6MJE4	NAD-dependent malic enzyme GN=maeA	2,553	12,037	1,660
Bd2852	Q6MJC8	Uncharacterized protein GN=Bd2852	4,271	0,506	2,539
Bd2948	Q6MJ38	Thiol:disulfide interchange protein tlpA GN=resA	0,407	2,209	1,722
Bd2951	Q6MJ35	30S ribosomal protein S4 A GN=rpsD1	2,641	0,747	0,838
Bd2957	Q6MJ30	50S ribosomal protein L30 GN=rpmD	3,665	0,783	1,277
Bd2958	Q6MJ29	30S ribosomal protein S5 GN=rpsE	3,540	0,911	1,225
Bd2965	Q6MJ24	50S ribosomal protein L14 GN=rplN	2,766	0,802	1,109
Bd2967	Q6MJ23	30S ribosomal protein S17 GN=rpsQ	2,475	0,770	1,623
Bd2971	Q6MJ19	50S ribosomal protein L22 GN=rplV	2,649	0,894	1,014
Bd2972	Q6MJ18	30S ribosomal protein S19 GN=rpsS	4,725	2,444	1,345
Bd2976	Q6MJ15	50S ribosomal protein L3 GN=rplC	3,228	0,838	0,632
Bd2979	Q6MJ13	Elongation factor G 1 GN=fusA1	2,743	2,324	2,231
Bd2987	Q6MJ06	50S ribosomal protein L7/L12 GN=rplL	4,923	0,981	1,297
Bd3048	Q6MIV0	Chaperone protein ClpB GN=clpB	6,539	14,195	1,641
Bd3059	Q6MIT9	Putative outer membrane protein GN=Bd3059	2,906	0,773	2,510
Bd3061	Q6MIT7	Uncharacterized protein GN=Bd3061	0,182	4,301	8,420
Bd3070	Q6MIS8	Uncharacterized protein GN=Bd3070	0,741	0,949	9,580
Bd3092	Q6MIQ9	Methyl-accepting chemotaxis protein GN=Bd3092	0,490	17,190	1,579
Bd3119	Q6MIN4	Uncharacterized protein GN=Bd3119	3,155	2,098	2,295
Bd3145	Q6MIL0	Uncharacterized protein GN=Bd3145	0,190	1,572	1,147
Bd3171	Q6MII6	Peptidyl-dipeptidase GN=dcp	4,637	0,864	1,324
Bd3178	Q6MIH9	Aconitate hydratase GN=acnA	4,769	4,042	1,579
Bd3180	Q6MIH7	Uncharacterized protein GN=Bd3180	0,157	1,592	0,699
Bd3192	Q6MIG6	Chemotaxis protein GN=mcp	839,289	17,330	1,215
Bd3223	Q6MID8	Sco1/SenC family protein GN=Bd3223	0,249	3,163	0,446
Bd3329	Q6MI45	Flagellar protein Flil GN=flil	0,380	0,430	1,858
Bd3349	Q6MI28	10 kDa chaperonin GN=groES	3,987	0,510	6,521
Bd3367	Q6MI13	Conserved sensor histidine kinase GN=Bd3367	0,396	4,578	1,293
Bd3395	Q6MHY9	Flagellar hook protein FlgE GN=flgE	0,729	0,486	4,835
Bd3399	Q6MHY5	Uncharacterized protein GN=Bd3399	0,036	37,756	0,342
Bd3427	Q6MHV7	Predicted hydrolase of the HAD superfamily GN=Bd3427	0,169	7,319	18,911
Bd3444	Q6MHU2	Delta-aminolevulinic acid dehydratase GN=hemB	0,559	0,623	55,806
Bd3449	Q6MHT9	Glutamate-1-semialdehyde 2,1- aminomutase GN=hemL	10,760	0,182	0,568
Bd3465	Q6MHS5	Putative transcriptional regulator GN=Bd3465	1,049	14,037	0,256
Bd3478	Q6MHR2	Ggt protein GN=ggt	0,476	3,843	2,090
Bd3510	Q6MHN0	General secretion pathway protein D GN=gspD	69,941	0,286	1,498
Bd3532	Q6MHK9	Uncharacterized protein GN=Bd3532	0,327	0,444	18,566
Bd3571	Q6MHH3	Outer membrane receptor for transport of vitamin B12, E colicins, and bacteriophage BF23 GN=btuB	0,320	1,894	6,549

Bd3579	Q6MHG6	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein GN=Bd3579	0,253	0,951	0,964
Bd3590	Q6MHF8	ABC-type daunorubicin resistance ATP-binding protein GN=drdA	0,795	10,357	0,342
Bd3610	Q6MHD9	Uncharacterized protein GN=Bd3610	0,421	0,982	1,879
Bd3701	Q6MH57	Uncharacterized protein GN=Bd3701	1,661	12,146	1,470
Bd3720	Q6MH41	Uncharacterized protein GN=Bd3720	0,362	6,521	9,604
Bd3737	Q6MH26	Uncharacterized protein GN=Bd3737	0,324	3,559	0,308
Bd3740	Q6MH23	Uncharacterized protein GN=Bd3740	10,830	1,110	1,233
Bd3749	Q6MH16	Lon protease GN=lon	3,263	0,589	2,127
Bd3757	Q6MH08	Uncharacterized protein GN=Bd3757	0,278	1,027	0,549
Bd3764	Q6MH01	Trigger factor GN=tig	15,759	0,800	1,862
Bd3780	Q6MGY6	30S ribosomal protein S2 GN=rpsB	2,528	0,733	1,651
Bd3782	P61331	Elongation factor Ts GN=tsf	5,253	0,805	1,058
Bd3792	Q6MGX7	Laccase domain protein GN=Bd3792	6,194	1,319	2,518
Bd3830	Q6MGU1	Uncharacterized protein GN=Bd3830	0,407	0,926	2,335
Bd3840	Q6MGT2	Probable O-linked GlcNAc transferase GN=Bd3840	0,392	1,851	3,500
Bd3849	Q6MGS3	50S ribosomal protein L21 GN=rplU	3,459	0,885	2,097
Bd3900	Q6MGM4	ATP synthase subunit delta GN=atpH	0,675	6,767	1,147
Bd3911	Q6MGL4	Highly similar to B. subtilis Jag protein GN=jag	16,955	0,568	1,706

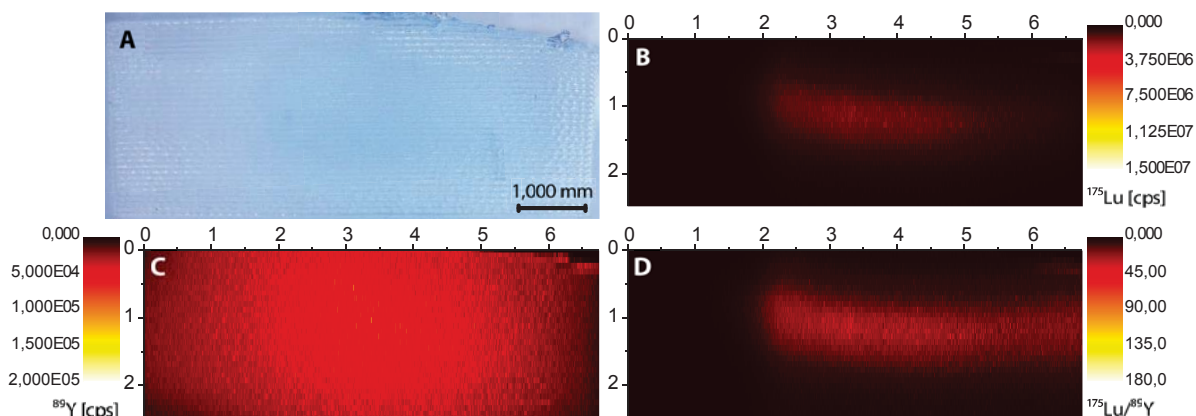


Abb. A1: Laserablationsbilder von lutetiummarkiertem α -Lactalbumin mit Yttrium als internem Standard (Experiment 1, Bande 1). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{89}Y -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

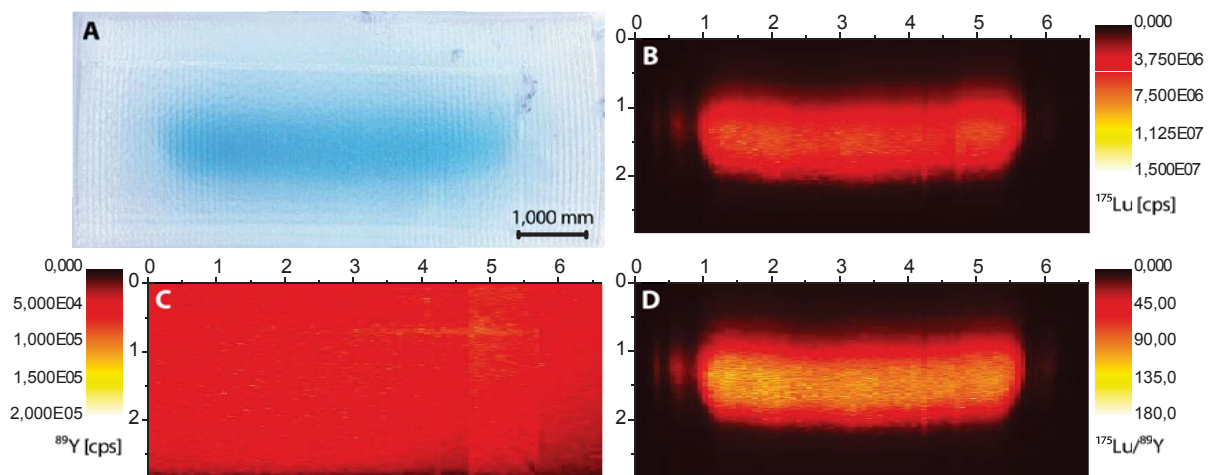


Abb. A2: Laserablationsbilder von lutetiummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Yttrium als internem Standard (Experiment 1, Bande 1). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{89}Y -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

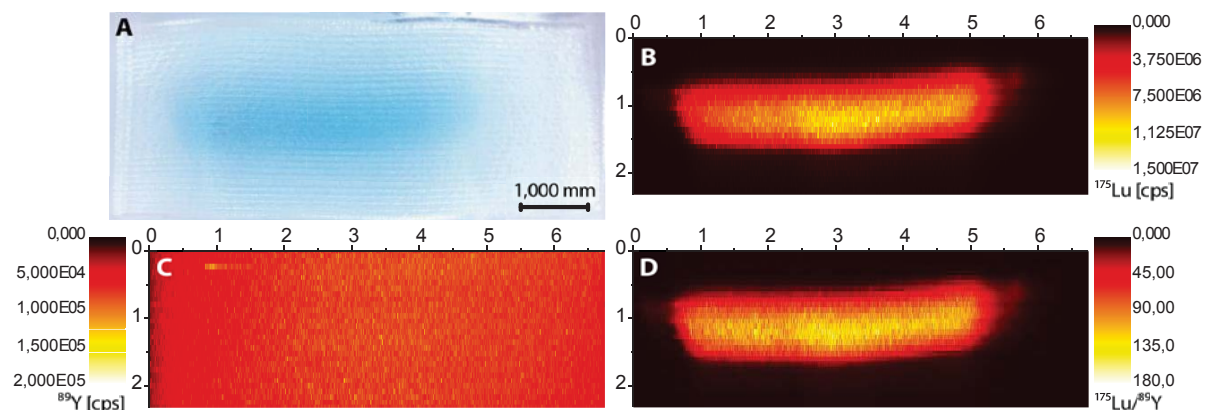


Abb. A3: Laserablationsbilder von lutetiummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Yttrium als internem Standard (Experiment 1, Bande 2). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{89}Y -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

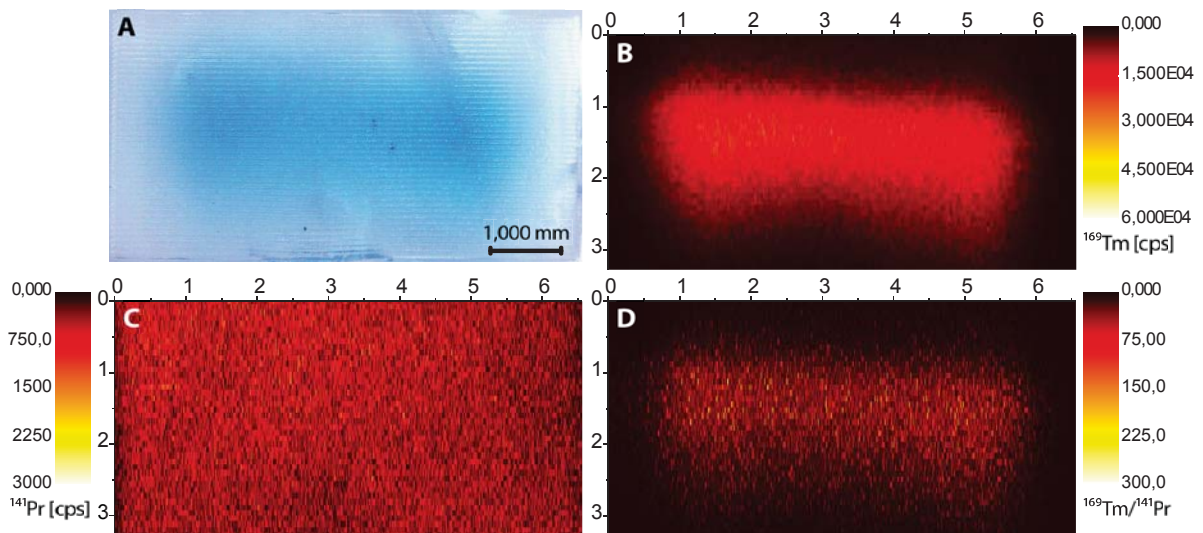


Abb. A4: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem α -Lactalbumin mit Praseodym als internem Standard (Experiment 2, Bande 1). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{141}Pr -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

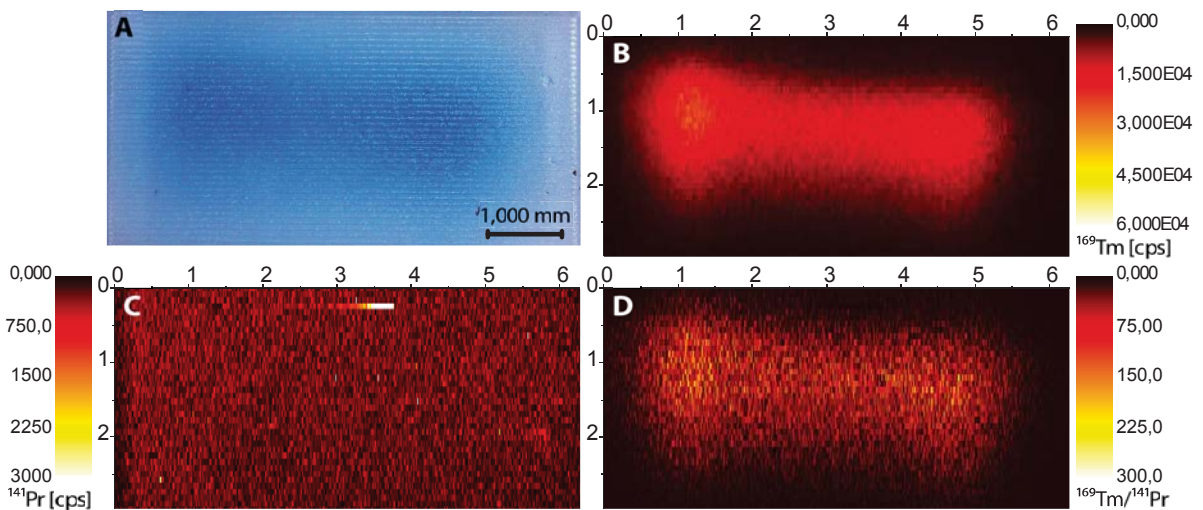


Abb. A5: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem α -Lactalbumin mit Praseodym als internem Standard (Experiment 2, Bande 2). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{141}Pr -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

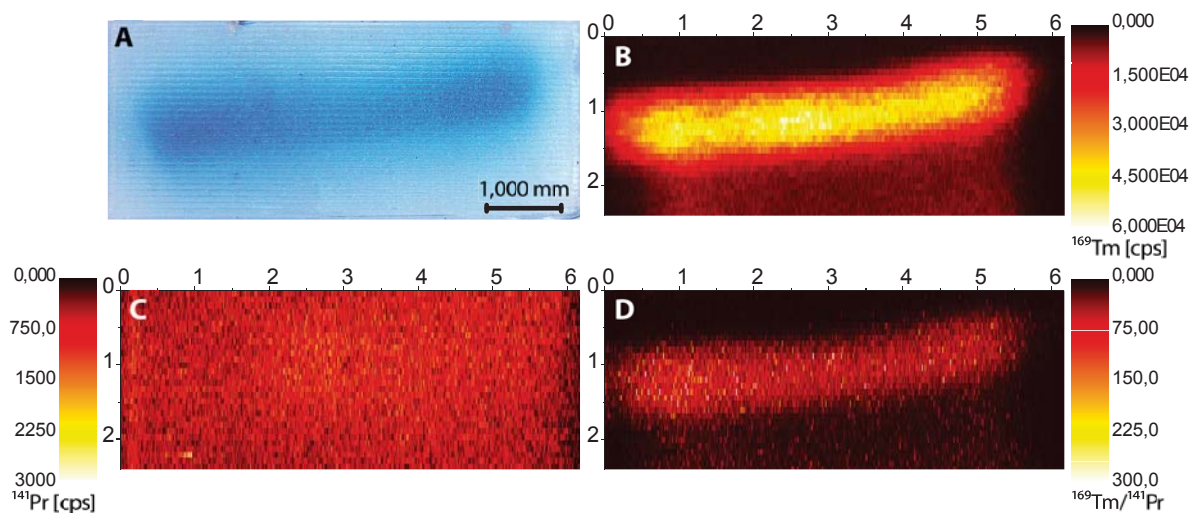


Abb. A6: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Praseodym als internem Standard (Experiment 2, Bande 1). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{141}Pr -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

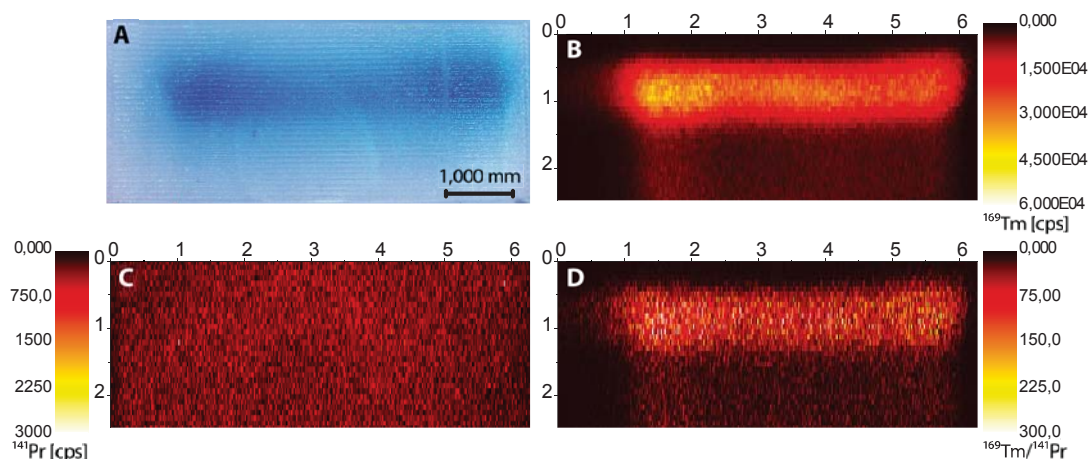


Abb. A7: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Praseodym als internem Standard (Experiment 2, Bande 2). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{141}Pr -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

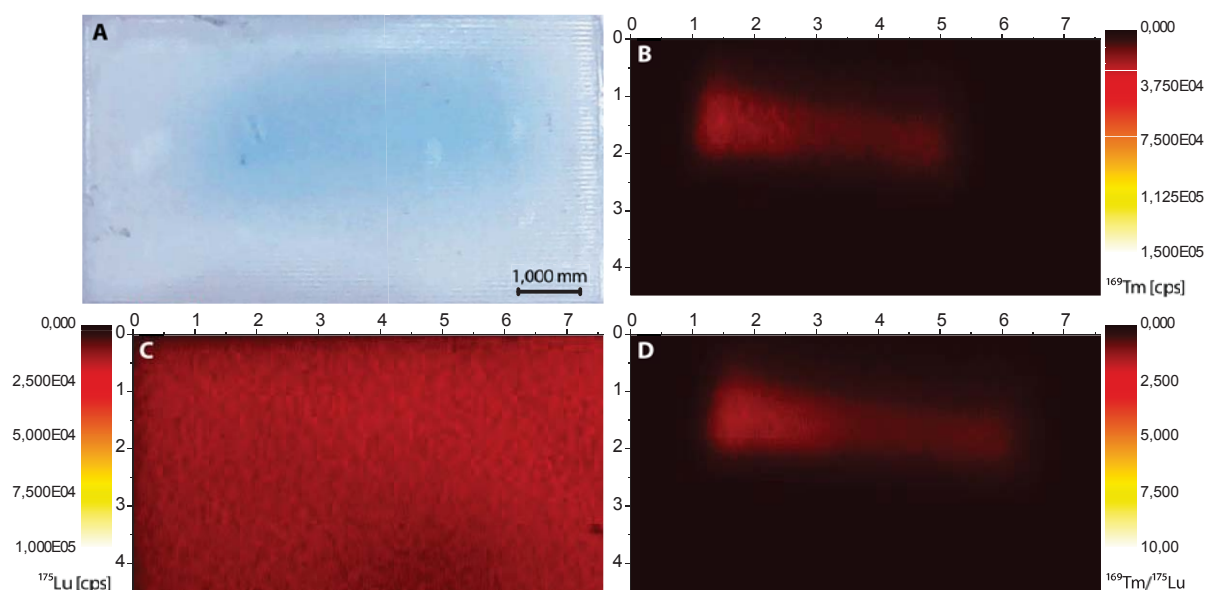


Abb. A8: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem α -Lactalbumin mit Lutetium als internem Standard (Experiment 3, Bande 2). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

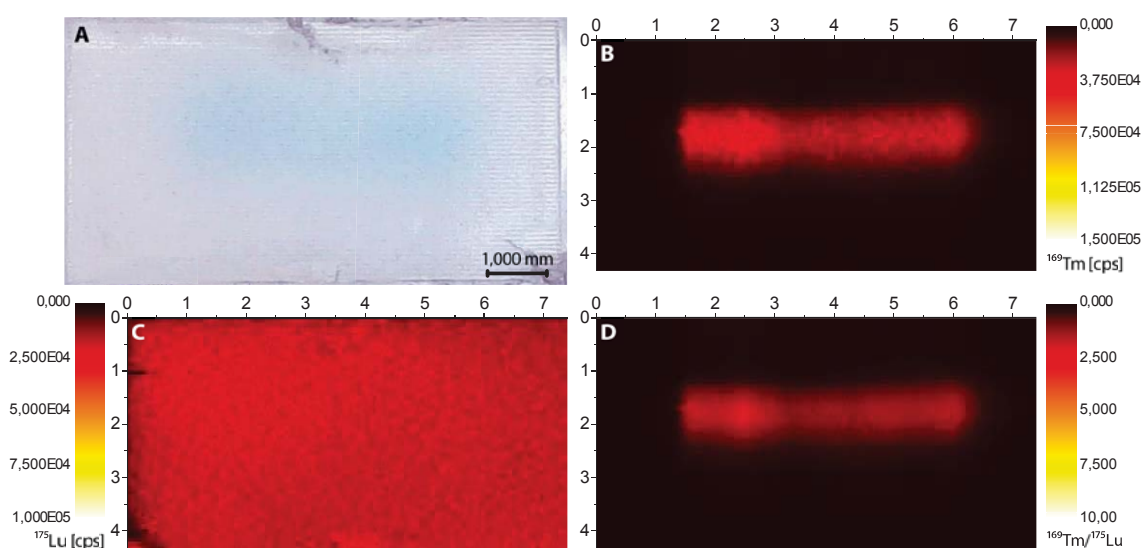


Abb. A9: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Lutetium als internem Standard (Experiment 3, Bande 1). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

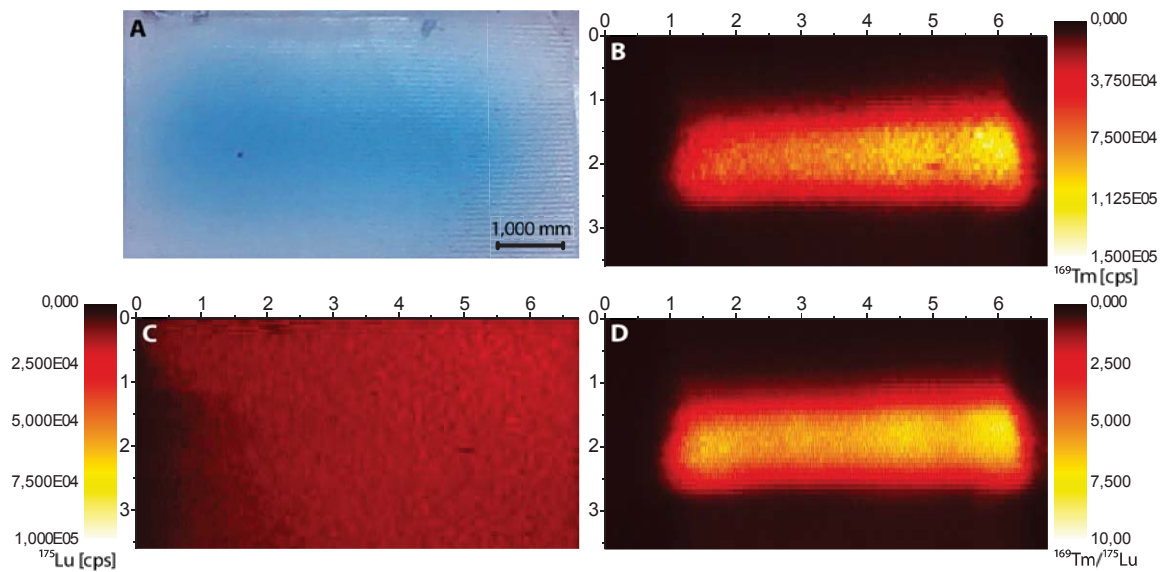


Abb. A10: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Lutetium als internem Standard (Experiment 3, Bande 2). Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals.

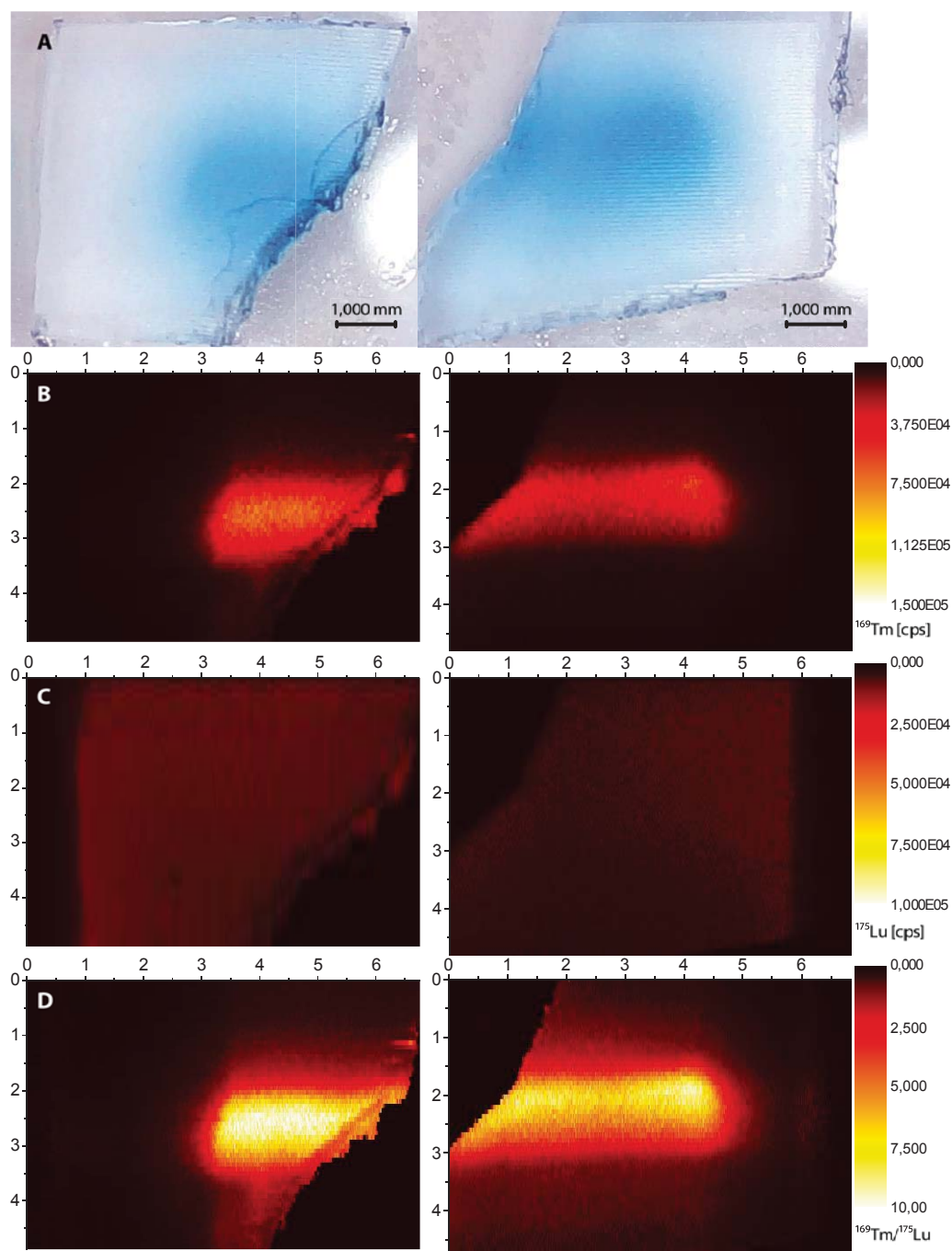


Abb. A11: Laserablationsbilder von thuliummarkiertem bovinem Serumalbumin mit Lutetium als internem Standard (Experiment 3, Bande 3). Bei der Prozessierung wurde die Bande in zwei Teile gespalten. Beide Teilstücke wurden separat gemessen. Die Intensitätsskalen gelten jeweils für beide Teilstücke. Die Achsenskalierungen sind jeweils in mm. **A:** Optische Aufnahme der Gelbande. **B:** Laserablationsbild des ^{169}Tm -Signals. **C:** Laserablationsbild des ^{175}Lu -Signals **D:** Laserablationsbild des normierten Analytsignals. Es wurde ein Intensitätsfilter angewandt (^{175}Lu -Signal mindestens 700 cps).

Tab. A3: Über die ROI-Funktion aus den LA-Bildern bestimmte Intensitäten der Banden von α -Lactalbumin- und bovinem Serumalbumin. Die Zuweisung der Banden entspricht der Zuordnung in Abbildung 31. Es wurde darauf geachtet, dass alle ROI-Flächen ähnliche Größen aufweisen.

	Summe Signalintensität (ROI)			Summe Signalintensität (ROI)	
Experiment 1	^{175}Lu [cps]	$^{175}\text{Lu}/^{89}\text{Y}$		^{175}Lu [cps]	$^{175}\text{Lu}/^{89}\text{Y}$
α -Lactalbumin 1	4,22E09	1,03E05	Bovines Serumalbumin 1	2,39E10	4,03E05
α -Lactalbumin 2	5,84E09	1,18E05	Bovines Serumalbumin 2	2,69E10	3,60E05
α -Lactalbumin 3	2,65E09	1,05E05	Bovines Serumalbumin 3	3,25E10	4,06E05
Experiment 2	^{169}Tm [cps]	$^{169}\text{Tm}/^{141}\text{Pr}$		^{169}Tm [cps]	$^{169}\text{Tm}/^{141}\text{Pr}$
α -Lactalbumin 1	1,55E08	3,91E05	Bovines Serumalbumin 1	2,40E08	4,04E05
α -Lactalbumin 2	1,25E08	5,18E05	Bovines Serumalbumin 2	1,50E08	5,38E05
Experiment 3	^{169}Tm [cps]	$^{169}\text{Tm}/^{175}\text{Lu}$		^{169}Tm [cps]	$^{169}\text{Tm}/^{175}\text{Lu}$
α -Lactalbumin 1	1,11E08	6,45E03	Bovines Serumalbumin 1	3,55E08	1,79E04
α -Lactalbumin 2	2,29E08	1,59E04	Bovines Serumalbumin 2	1,24E09	9,31E04
α -Lactalbumin 3	4,66E08	5,53E04	Bovines Serumalbumin 3	9,77E08	1,79E05

Tab. A4: Über die ROI-Funktion ermittelte Intensität des Signals von 32,4 mm bis 34,4 mm in Abbildung 34. Es wurden die gleichen Probenbezeichnungen verwendet.

Verhältnis	$\text{Ho}_{\text{norm-separat}}/\text{Lu}_{\text{norm-separat}}$	$\text{Ho-Mischung}/\text{Lu-Mischung}$	$\text{Ho-separat}/\text{Lu-separat}$
Aufsummierte Intensität ROI	5,65	5,87	4,86